

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DE LA CONSERVACIÓN SOBRE LA
FISIOLOGÍA ESPERMÁTICA DE SEMEN CAPRINO**

Memoria presentada por la licenciada Dña. Susana Cortés Gallego
para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.



ARCHIVO

Vº Bº

Dra. Isabel Vázquez González

Dra. Rocio Núñez Calonge

Dña. Susana Cortés Gallego

A MIS PADRES

Deseo expresar mi mas sincero agradecimiento por la inestimable ayuda aportada a lo largo de este trabajo:

A Isabel Vázquez González y Rocío Núñez Calonge, por todos los conocimientos que me han transmitido y especialmente por saber sacar de mi el máximo rendimiento con su amistad, comprensión y apoyo.

A Antonio López Sebastián, Coordinador del Área de Reproducción Animal donde ha sido desarrollado este trabajo.

A M^a Luisa Vinader Marquina, por su ayuda en la parte experimental de este trabajo y sin la cual habría sido demasiado tedioso y aburrido.

A Concepción Díaz Yubero y Purificación Martín Sanz, por su ayuda y paciencia demostrada conmigo en la realización de todos los diluyentes y reactivos químicos necesarios en este trabajo.

A M^a Carmen Garcia Yanes por su ayuda a la hora de resolver los problemas de tipo administrativo.

A Gustavo Barja de Quiroga por haber aceptado la tutoria de esta Tesis.

A Blanca de la Fuente, por su inestimable ayuda en el análisis de los resultados.

A Pedro Lorenzo por su colaboración en el desarrollo de la fecundación “in vitro”.

A Pedro Caballero y su equipo por su apoyo y amistad, y en especial a Federico Parra por ayudarme con infinita paciencia a resolver la multitud de interrogantes informáticos.

A Concepción Borque Ibarra, Raúl Sanchez, Pedro G^a Casado, Amelia Gómez Brunet, M^a Jesus Cocero y Blanca Cabellos por el constante interés demostrado en estos

años, y especialmente a Ana del Campo, Marta G^a López, Rosana Picazo, Antonio González-Bulnes y Julián Santiago por su apoyo incondicional así como por su ayuda en todo lo referente a la salud y bienestar de los machos cabrios utilizados.

A Juan Carlos Gonzalez, Alfredo Manjón, Alejandro Checa y Claudio Benito, no solo por su ayuda y firme colaboración en todo lo referente al mantenimiento y entrenamiento de los animales sino por su humor y amistad.

A todos mis amigos por su inestimable ayuda y apoyo constante durante estos años.

A mis abuelos, tíos, primos, y familia Moya, por su eterno cariño y preocupación demostrada durante el desarrollo de esta Tesis.

A Antonio Ferruelo por soportar mis nervios y mal humor en la recta final de este trabajo, y sobre todo por las horas que no le he dedicado.

A mis padres y hermana, por su estímulo y apoyo, sin los que me hubiese resultado difícil finalizar esta memoria, así como por su paciencia, cariño y amor que siempre me han dado.

A mis “chivos”, sin los cuales indudablemente no hubiese sido posible realizar este trabajo.

Este trabajo ha sido financiado por el M.A.P.A. (R-18819) sin cuya aportación no hubiese sido posible la finalización de esta Tesis.

INDICE

1.- <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. OBJETIVOS	3
2.- <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	5
2.1. RECOGIDA Y CONTRASTACIÓN SEMINAL	6
2.1.1. <u>Recogida de semen</u>	6
2.1.1.1. Vagina artificial	7
2.1.2. <u>Contrastación seminal</u>	11
2.1.2.1. Análisis macroscópico	12
2.1.2.1.1. Volumen	12
2.1.2.1.2. Aspecto físico	12
2.1.2.2. Análisis microscópico	13
2.1.2.2.1. Movilidad masal	13
2.1.2.2.2. Movilidad individual	13
2.1.2.2.3. Concentración espermática	14
2.1.2.2.4. Formas anormales	15
2.1.2.2.5. Complejo acrosómico	16
2.1.2.2.6. Test de permeabilidad de membrana	18
2.1.2.2.7. Tinciones vitales	19
2.1.2.3. Análisis bioquímico	20
2.2. CARACTERÍSTICAS SEMINALES DEL EYACULADO DEL MACHO CABRÍO	21
2.3. CONSERVACIÓN DEL SEMEN CAPRINO	25
2.3.1. <u>Dilución</u>	26
2.3.2. <u>Diluyentes</u>	27
2.3.3. <u>Diluyentes de refrigeración</u>	29

2.3.3.1. Leche de vaca	30
2.3.3.2. Yema de huevo	31
2.3.3.3. Agua de coco	32
2.3.4. <u>Diluyentes de congelación</u>	32
2.3.5. <u>Refrigeración de semen caprino</u>	35
2.3.6. <u>Congelación de semen caprino</u>	35
2.3.6.1. Descongelación de dosis	38
 2.4. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	38
2.4.1. <u>Membrana plasmática</u>	40
2.4.2. <u>Regulación iónica durante la capacitación</u>	44
2.4.2.1. Iones Calcio	44
2.4.2.2. Iones Sódio y Potasio	46
2.4.3. <u>Factores de decapitación</u>	47
2.4.4. <u>Hiperactivación</u>	47
2.4.5. <u>Reacción acrosómica</u>	49
2.4.5.1. Inductores de la reacción acrosómica	53
2.4.5.1.1. Ionóforos	53
2.4.5.1.2. Zona pelúcida	55
2.4.5.1.3. Líquido folicular, oviductal y células del cúmulo	56
2.4.5.1.4. Progesterona	56
2.4.5.1.5. Moduladores metabólicas	57
2.4.5.1.6. Efecto de la disminución térmica	57
2.4.5.1.7. Otros factores	58
2.4.5.2. Técnicas de detección de la RA	59
2.4.6. <u>Capitación “in vitro”</u>	61
 2.5.FECUNDACIÓN	64
2.5.1. <u>Fecundación “in vitro”</u>	65

2.5.2.1. Test de Hamster	68
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	72
3.1. MATERIAL	73
3.1.1. <u>Material biológico</u>	73
3.1.1.1. Machos reproductores	73
3.1.1.2. Huevos de gallina	73
3.1.1.3. Ovocitos de hamster	74
3.1.2. <u>Material empleado en la recogida del semen</u>	74
3.1.3. <u>Material empleado en la conservación del semen</u>	75
3.1.4. <u>Material de laboratorio</u>	75
3.1.5. <u>Material químico</u>	77
3.1.5.1. Reactivos utilizados en la conservación del semen (refrigeración y congelación)	77
3.1.5.2. Reactivos utilizados en la triple tinción	77
3.1.5.3. Reactivos utilizados en la inducción de la reacción acrosómica	78
3.1.5.4. Reactivos utilizados en la tinción vital	78
3.1.5.5. Reactivos utilizados en el sistema FIV	78
3.1.5.6. Otros reactivos	79
3.2. MÉTODO	79
3.2.1. <u>Obtención y contrastación seminal</u>	79
3.2.2. <u>Capacitación de semen fresco</u>	82
3.2.2.1. Medio de lavado. PBS-Dm	82
3.2.2.2. Medio de cultivo. BWB	83
3.2.2.3. Capacitación de semen fresco	84
3.2.3. <u>Capacitación de semen refrigerado</u>	86
3.2.3.1. Diluyentes de refrigeración	86
3.2.3.2. Refrigeración de semen caprino	88

3.2.3.3. Capacitación de semen refrigerado	90
3.2.4. <u>Capacitación de semen congelado</u>	92
3.2.4.1. Diluyentes de congelación	92
3.2.4.2. Congelación de semen caprino	92
3.2.4.3. Descongelación de dosis seminales	94
3.2.4.4. Capacitación de semen congelado	94
3.2.5. <u>Contrastación del semen capacitado</u>	96
3.2.5.1. Movilidad individual	96
3.2.5.1.1. Solución acuosa de citrato sódico isoosmótico.....	96
3.2.5.1.2. Protocolo.....	96
3.2.5.2. Índice de vitalidad	97
3.2.5.2.1. Solución de trabajo de naranja de acridina.....	97
3.2.5.2.1. Protocolo.....	98
3.2.5.3. Estatus acrosomal	99
3.2.5.3.1. Glutaraldehído al 2% en BL-1.....	99
3.2.5.3.2. Protocolo.....	99
3.2.5.4. Test de permeabilidad de membrana	101
3.2.5.4.1. Solución hipoosmótica.....	101
3.2.5.4.2. Protocolo.....	101
3.2.5.5. Triple tinción	103
3.2.5.5.1. Colorantes empleados en la triple tinción.....	103
3.2.5.5.2. Protocolo.....	103
3.2.6. <u>Inducción de la reacción acrosómica</u>	106
3.2.6.1. Ca^{2+} ionóforo. Solución de trabajo.....	106
3.2.6.2. Protocolo.....	106
3.2.7. <u>Test de hamster (T.H.)</u>	109
3.2.7.1. Descongelación de ovocitos.....	109
3.2.7.2. Protocolo.....	110

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	115
3.3.1. <u>Experiencia 1: Efecto de los procesos de conservación del semen caprino sobre su perfil de capacitación y viabilidad espermática “in vitro”</u>	115
3.3.2. <u>Experiencia 2: Efecto inductor del Ca²⁺ ionóforo sobre la reacción acrosómica en semen caprino heterospérmico puro, refrigerado y congelado (Test ARIC).</u>	115
3.3.3. <u>Experiencia 3: Fecundación “in vitro” en semen caprino capacitado. Correlación con otras técnicas laboratoriales</u>	116
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	116
4. RESULTADOS	118
4.1. EFECTO DE LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN DEL SEMEN CAPRINO SOBRE SU PERFIL DE CAPACITACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA “IN VITRO”	119
4.1.1. <u>Capacitación de semen caprino fresco</u>	119
4.1.1.1. Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles y vivos	121
4.1.1.2. Evolución de la calidad de movimiento	122
4.1.1.3. Evolución del porcentaje de espermatozoides con normalidad acrosómica y endósmosis positiva	123
4.1.1.4. Evolución de la vitalidad espermática y estatus acrosomal	124
4.1.2. <u>Capacitación de semen caprino refrigerado</u>	127
4.1.2.1. Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles	127

4.1.2.2. Evolución de la calidad de movimiento	129
4.1.2.3. Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos	130
4.1.2.4. Evolución del porcentaje de espermatozoides con normalidad acrosómica	132
4.1.2.5. Evolución del porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva	133
4.1.2.6. Evolución de la vitalidad espermática y estatus acrosomal	135
4.1.2.7. Influencia de la refrigeración sobre el perfil de capacitación del semen caprino	141
4.1.3. Capacitación de semen caprino descongelado	143
4.1.3.1. Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles.....	144
4.1.3.2. Evolución de la calidad de movimiento	145
4.1.3.3. Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos	147
4.1.3.4. Evolución del porcentaje de espermatozoides con normalidad acrosómica	148
4.1.3.5. Evolución del porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva	150
4.1.3.6. Evolución de la vitalidad espermática y estatus acrosomal	151
4.1.3.7. Influencia de la congelación sobre el perfil de capacitación del semen caprino	157
4.1.4. Influencia de los procesos de conservación espermática sobre la capacitación del semen caprino	159

4.2. EFECTO INDUCTOR DEL Ca^{2+} IONÓFORO SOBRE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN SEMEN CAPRINO

HETEROSPÉRMICO PURO, REFRIGERADO Y CONGELADO (TEST ARIC)	166
4.3. FECUNDACIÓN “IN VITRO” CON SEMEN CAPRINO CAPACITADO. CORRELACIÓN CON OTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	173
5. DISCUSIÓN	177
5.1. EFECTO DE LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN DEL SEMEN CAPRINO SOBRE SU PERFIL DE CAPACITACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA “IN VITRO”	178
5.2. EFECTO INDUCTOR DEL CA 2+ IONÓFORO SOBRE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN SEMEN CAPRINO HETEROSPÉRMICO PURO, REFRIGERADO Y CONGELADO (TEST ARIC)	184
5.3. FECUNDACIÓN “IN VITRO” CON SEMEN CAPRINO CAPACITADO. CORRELACIÓN CON OTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	188
6. CONCLUSIONES	191
7. RESUMEN	193
7.1. SUMMARY	196
8. ABREVIATURAS	198

9. BIBLIOGRAFÍA.....	202
-----------------------------	------------

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las implicaciones económicas derivadas de la producción de ciertas especies ganaderas han hecho que aquellas de mayor rendimiento, sobre todo la bovina y la porcina, sean las más estudiadas en el terreno de la fisiología reproductiva y biología del espermatozoide, estimulando su selección y desarrollo. Por contra, especies como la caprina, han sido relegadas hasta los años 80 debido a su carácter marginal, no existiendo demasiados estudios sobre el comportamiento espermático en esta especie.

No obstante, los excedentes generados de carne y leche, no sólo en España sino también en la Unión Europea en los 90, han obligado a los ganaderos a un cambio de mentalidad, incorporando nuevas tecnologías para aumentar las productividades individuales. Esta nueva adaptación del sector implica la utilización de programas de selección genética e incorporación de técnicas de Reproducción Asistida, principalmente de la Inseminación Artificial (I.A.) debido a su bajo coste y buenos resultados. La inseminación se realizará con células espermáticas conservadas durante unas cuantas horas (semen refrigerado) o durante tiempos más prolongados que implican la utilización de sustancias criogénicas con el fin de mantener la viabilidad celular durante largos periodos de tiempo (semen congelado).

Sin embargo, uno de los problemas esenciales que se nos plantean a la hora de planificar un programa de IA es la elección de los animales reproductores, los cuales no sólo han de presentar un buen estado fisiológico y morfológico de acuerdo con la raza, sino que nos es preciso conocer e identificar todos los procesos implicados en el sistema reproductor con el fin de eliminar los animales infértiles o subfértiles.

Los espermatozoides obtenidos inmediatamente tras la eyaculación no poseen las condiciones necesarias para poder penetrar las cubiertas del ovocito e iniciar los procesos de fusión gamética. El proceso que lo habilita para la fertilización del gameto

femenino, y que se conoce bajo el término de "capacitación", se realiza en el tracto genital de la hembra durante el tiempo que los espermatozoides atraviesan la vagina, cervix, cuernos uterinos y oviductos. Este proceso aún no está bien definido ni estudiado, sobre todo en el caso del ganado caprino, siendo su conocimiento determinante para conseguir unos buenos resultados de fertilidad desde el punto de vista de producción animal.

El proceso de elaboración de las dosis seminales es de vital importancia para que, cuando se realice la inseminación de las mismas en el tracto de la hembra, se logren unas tasas altas de fecundación. Hasta ahora, parámetros espermáticos tales como la concentración, movilidad y morfología eran los únicos que se tenían en cuenta a la hora de evaluar un eyaculado. No obstante, la capacidad fertilizadora conlleva otra serie de características, como es el estado de capacitación (lo cual implica, a su vez, la capacidad del espermatozoide para sufrir la reacción acrosómica), y todo ello con el fin último de conseguir unos óptimos resultados de fertilización. Sin embargo, el conocimiento sobre el macho cabrío se ha limitado casi exclusivamente al estudio de diluyentes de refrigeración y congelación para su aplicación en programas de inseminación artificial, no encontrando apenas bibliografía del efecto que ejercen dichos medios sobre la fisiología espermática.

Debido al papel decisivo que juega la capacitación espermática en los procesos de fertilización "in vivo" y al escaso conocimiento que sobre dichos procesos fisiológicos que se tiene en el ganado caprino, se planteó el estudio del efecto ejercido por los diluyentes utilizados en la refrigeración y congelación de semen caprino de manera rutinaria, así como la metodología empleada para dicho fin sobre la viabilidad y capacidad fecundante del espermatozoide de macho cabrío.

1.1. OBJETIVOS

Bajo esta hipótesis de trabajo se definieron los siguientes objetivos:

- 1.-** Determinar el perfil de capacitación y reacción acrosómica en semen caprino en dosis heterospérmicas.
- 2.-** Determinar la influencia de los procesos de refrigeración y congelación de dosis seminales sobre dicho perfil.
- 3.-** Determinar el efecto inductor del calcio ionóforo sobre la fisiología espermática caprina y su posible utilización como método de diagnosis de la influencia de los procesos de conservación espermática sobre la capacidad fertilizante de un eyaculado.
- 4.-** Establecer la relación existente entre todos los parámetros estudiados anteriormente “in vitro” y el test de hamster.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. RECOGIDA Y CONTRASTACIÓN SEMINAL

Los planes de mejora de una especie se apoyan en distintas técnicas de reproducción con el fin de aumentar las producciones individuales, entre las que se encuentran la Inseminación Artificial (IA), Fecundación "in vitro" (FIV) y Transferencia de embriones (TE) principalmente. Sin embargo, el método más rápido de mejora genética dentro de una explotación es la utilización de la IA a partir de sementales portadores de los caracteres deseados, siendo aproximadamente su influencia de un 30-40% sobre la producción individual de las hijas.

La fase inicial de un programa de inseminación artificial es la selección de los reproductores en base a su valor individual (características morfológicas y fisiológicas, edad, ...), estado sanitario, aptitud dentro de la explotación (lechera o cárnica) y datos de producción de sus descendientes (Cuenca Sánchez, 1982; Quittet, 1986). La observación del comportamiento sexual del macho cabrío, libido y fertilidad, es otro factor determinante en la elección de los sementales, ya que un macho con buena fertilidad pero baja actividad sexual presentará problemas tanto en el número de hembras cubiertas por monta natural o dirigida como en la recogida de semen con vagina artificial (Maxwell y Evans, 1990).

2.1.1. RECOGIDA DE SEMEN

La recogida del semen se puede realizar empleando diversas metodologías, siendo las más empleadas en pequeños rumiantes: post-coital, electroeyaculación y vagina artificial (Graham et al., 1978 a; Pérez y Pérez, 1986; Maxwell y Evans, 1990). La utilización de uno u otro método está en función de las características del macho reproductor, utilizando el post-coito y la electroeyaculación en individuos con problemas físicos que imposibilitan la monta, así como en animales jóvenes y en machos

mal entrenados que se niegan a saltar en presencia del personal técnico.

La obtención de semen post-mortem es un método utilizado en animales que mueren en pleno rendimiento funcional y en especies salvajes o asilvestradas abatidas en cacerías (ciervo, gamo, muflón, ...), obteniendo un número limitado de dosis (**Garde et al., 1996; Vinader et al., 1996 b**). La existencia de animales salvajes en cautiverio permite obtener dosis seminales mediante electroeyaculación o vagina artificial, si bien, debido al riesgo de aplicación de la electroeyaculación, se tiende a la utilización de la vagina artificial en especies cinegéticas, siendo un requisito imprescindible la domesticación de los sementales (**Krzywinski y Jaczewski, 1978; Cortés et al., 1996**).

2.1.1.1. VAGINA ARTIFICIAL

La recogida de semen mediante vagina artificial es el método más usado en ganado ovino y caprino debido a su rapidez y limpieza, permitiendo la obtención de varios eyaculados consecutivos (**Abraham y Agran, 1987; Maxwell y Evans, 1990; Herrera et al., 1994**). Sin embargo, su empleo requiere el entrenamiento de los sementales, existiendo machos que se habitúan sin dificultad a la vagina artificial, mientras que otros no son capaces de vencer la inhibición de la conducta sexual provocada por la presencia del hombre (**Maxwell y Evans, 1990**). En nuestra experiencia personal, el porcentaje de machos que no logran ser entrenados es inferior al 5%.

La vagina artificial, diseñada originalmente por Spallanzani para perro, ha sufrido diversas modificaciones en cuanto a su longitud y diámetro en función de las características anatómicas y fisiológicas de cada especie. La vagina artificial utilizada para pequeños rumiantes (**Fig. 1**) (**Maxwell y Evans, 1990**) consta de:

- 1) *Cuerpo rígido* (de metal o caucho), que incluye una válvula de doble espita a través de la cuál se añade agua y aire;
- 2) *Camisa interna*, de pared delgada que forma una cámara al doblarse hacia el exterior;
- 3) *Tubo cónico* o intermediario, que sirve de unión entre el cuerpo rígido y el tubo colector;
- 4) *Tubo colector*, situado al final del tubo cónico y generalmente de 10 ml de capacidad, graduado en 0,1 ml;
- 4) *Manta*, encargada de mantener la temperatura y proteger el semen frente a la luz .

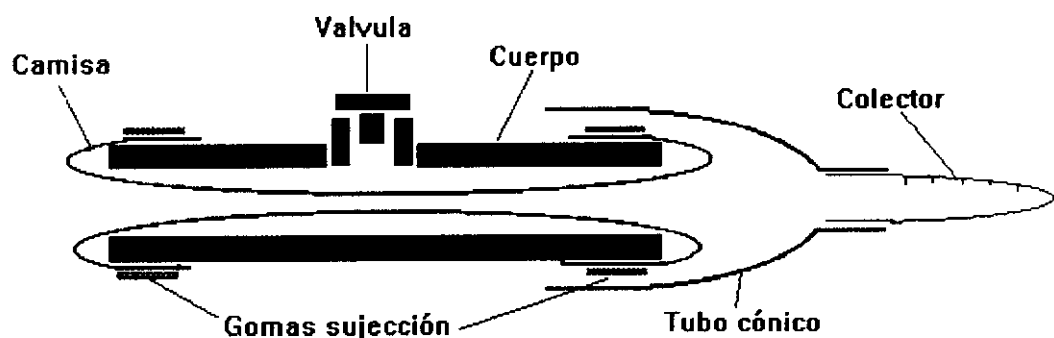


Fig.1.- Sección esquemática de la vagina artificial diseñada para ovino y caprino

La vagina artificial se carga con agua caliente a 50°C y se insufla aire a través de su doble válvula con el objetivo de imitar las condiciones fisiológicas de temperatura y presión de la vagina de la hembra. La temperatura en el momento de la recogida debe estar entre 40 y 45°C. La presión más aceptada por los sementales se logra insertando el dedo índice de la mano dentro de la cavidad de la vagina artificial, debiéndose sentir una pequeña presión (**Maxwell y Evans, 1990**). Tras su montaje, la vagina artificial permanecerá en una estufa de 37°C hasta el momento de su utilización. En programas de selección es imprescindible asignar una vagina artificial a cada macho con el fin de no mezclar eyaculados.

Para condicionar el reflejo eyaculatorio del macho cabrío se utiliza una cabra ovariectomizada e inmovilizada mediante un potro de sujeción. El operario, situado en el lado derecho de la hembra, coloca la vagina artificial en dicho flanco, sujetándola con la mano derecha de tal forma que el extremo abierto quede mirando hacia el macho y abajo, con una inclinación aproximada de 45°. La válvula de la vagina debe dirigirse hacia abajo, evitando el contacto con el animal. En el momento del salto, se dirige con la mano izquierda el pene hacia el interior de la vagina, procurando hacerlo siempre del prepucio para evitar la retracción del mismo. Cuando el pene entra en contacto con la superficie caliente de la vagina artificial, el semental da el característico "golpe de riñón" y eyacula dentro del extremo superior del tubo recolector (**Quittet, 1986; Maxwell y Evans, 1990**) (**Fig. 2**).



Fig. 2.- Obtención de semen de macho cabrío mediante vagina artificial

El régimen sexual a que se someten los sementales incide sobre la calidad seminal de los eyaculados obtenidos (Okere et al., 1986; Thwaites, 1995), siendo la frecuencia de recogida de semen establecida en dos veces por semana en los animales más jóvenes, mientras que en individuos adultos puede aumentarse a tres obtenciones, recogiendo en cualquier caso dos eyaculados consecutivos (Abraham, 1987; Maxwell y Evans, 1990; Sahni y Tiwari, 1992; Herrera et al., 1994).

El ritmo de recogida más frecuentemente empleado según la bibliografía es de un eyaculado en una o dos sesiones/semana (Corteel, 1976; Mann, 1981;

Greyling y Grobbelaar, 1982). Nuestra experiencia demuestra que los machos con baja frecuencia de recogida producen eyaculados con tendencia a la aglutinación.

2.1.2. CONTRASTACIÓN SEMINAL

El análisis del semen tiene por objeto valorar la calidad de un eyaculado, y la funcionalidad del macho como reproductor. Actualmente, existen múltiples técnicas de laboratorio para la determinación de la calidad seminal, no siendo aconsejable la utilización de un solo análisis para valorar la viabilidad del semen (**Hafez, 1989; Maxwell y Evans, 1990; Boixo, 1994**).

El método definitivo en la valoración de la capacidad fecundante del semen es el nacimiento de un nuevo individuo. Sin embargo, el tiempo y dinero requerido para ello hacen que los ensayos de fertilidad en campo mediante la cubrición de hembras no sean frecuentemente utilizados, tratando de desarrollar métodos alternativos "in vitro" que se correlacionen con la fertilidad.

La necesidad de utilización de diferentes técnicas en la valoración de la calidad de un eyaculado se debe a la falta de existencia de una sola prueba que determine su fecundidad, debido en gran parte, a que el espermatozoide es una célula altamente especializada y con una función biológica compleja, influenciada por multitud de factores externos "in vitro" (tratamientos seguidos en el laboratorio para su capacitación, conservación, ...) o "in vivo" (cambios en el medio a lo largo de su paso por el tracto reproductor de la hembra).

2.1.2.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO

2.1.2.1.1. Volumen

La determinación del volumen se realiza inmediatamente después de su recogida, valorándolo directamente en el tubo colector (graduado en 0,1 ml), evitando el error producido al pasar el eyaculado de un recipiente a otro para su valoración (**Maxwell y Evans, 1990**). La determinación precisa del volumen de un eyaculado es imprescindible para determinar el número total de espermatozoides contenido en el mismo.

El volumen medio de un eyaculado en ganado caprino es de 1 ml, existiendo variaciones según el método de recogida, especie, estado fisiológico del macho, raza, edad, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete (**Derivaux, 1982; Memon et al., 1986; Pérez, 1992; Cortés et al., 1994b**).

2.1.2.1.2. Aspecto físico

El color del semen caprino varía del blanco cremoso al amarillento. Dicha coloración, producida por la presencia de riboflavinas en el plasma seminal (**Mendoza et al., 1989**), está sujeta a variaciones raciales e individuales. Tonalidades grises y/o pardas, y rosáceas son indicadores de contaminación y/o infección del sistema reproductor; y de la presencia de hematíes en el semen (debido principalmente a lesiones del pene durante la recogida) respectivamente (**Abraham, 1987**).

La densidad que presenta el semen de pequeños rumiantes es debido a su alta concentración (**Maxwell y Evans, 1990**).

2.1.2.2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

2.1.2.2.1. Movilidad masal

Esta prueba valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. La onda de movimiento sólo puede ser observada en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes (Carbonero, 1954; Maxwell y Evans, 1990).

La valoración de la movilidad masal se realiza mediante microscopía óptica a 10x sobre una gota de semen puro colocada sobre un portaobjetos atemperado a +37°C. La clasificación varía en función de la escala utilizada: de 0 a 5 (Maxwell y Evans, 1990); 0 a ++ (Pérez y Pérez, 1986).

2.1.2.2.2. Movilidad individual

La movilidad individual es una de las pruebas que con mayor frecuencia se utilizan para evaluar la calidad seminal y en algunas especies parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide (Maxwell y Evans, 1990; Pomerol y Arrondo, 1994).

La movilidad espermática se valora rutinariamente de manera subjetiva mediante un microscopio óptico (a 10x ó 20x) sobre una gota de semen diluido en una solución isosmótica, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles y su calidad de movimiento (Maxwell y Evans, 1990). La utilización de métodos fotográficos y sistemas computerizados han relegado a un segundo plano la valoración subjetiva por parte de los técnicos (O'Connor et al., 1981; Hunter, 1982; Burkman, 1995). Los actuales sistemas de análisis de imagen asistidos por

ordenador ó sistemas C.A.S.A (Computer-Assisted- Sperm-Analysis) son capaces de determinar, de manera objetiva, toda una serie de parámetros de velocidad y angularidad (O'Connor et al., 1981; Jasko et al., 1988; Tuli et al., 1992; Theau-Clement et al., 1996), que colaboran en el establecimiento de un grado de calidad de movimiento (Ginsburg et al., 1988; Burkman, 1995; Nuñez et al., 1996).

El movimiento desarrollado por los espermatozoides es característico de especie y del estado fisiológico en que se encuentre (movimiento tras la eyaculación, dilución, refrigeración, congelación, hiperactivación, ...) (Ginsburg et al., 1988; Pérez et al., 1994; Burkman, 1995; Vinader et al., 1996 a), estando sujeto también al efecto ejercido por el método de recogida, factores ambientales, manejo del semen tras su obtención (Maxwell y Evans, 1990).

Existen variaciones estacionales relativas a la movilidad de los espermatozoides de macho cabrío, estando relacionadas con la fertilidad (Maxwell y Evans, 1990; Pérez, 1992).

2.1.2.2.3. Concentración espermática

La concentración espermática viene definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen (expresado normalmente en millones por ml) de eyaculado. Los diferentes métodos utilizados para su cálculo varían en función de la rapidez y seguridad.

La determinación de la concentración espermática mediante hematímetros y cámaras cuentaglobulos se realiza tras una dilución 1/200 en una solución acuosa de Eosina básica. Si bien esta técnica es muy segura, el tiempo requerido para cada

contaje hace que dicha técnica sólo se aplique cuando el número de muestras a evaluar no sea muy grande (Sorensen, 1982; Abraham, 1987).

Otro método de recuento directo es la utilización de contadores de partículas (Vázquez et al, 1984 b; Maxwell y Evans, 1990), de gran precisión y seguridad; sin embargo, el alto costo de estos sistemas han impedido su amplia difusión.

La técnica más empleada en la valoración de la concentración espermática es la espectrofotometría. La concentración seminal es obtenida mediante una tabla de conversión, asignando a cada valor de transmitancia un valor de concentración previamente calculado mediante recuento directo ó contador de partículas (Sorensen, 1982; Boixo, 1994). Las diferentes tonalidades de color presentes en los eyaculados caprinos no interfieren en el resultado obtenido mediante esta técnica debido al título de la dilución empleada (Campos et al., 1994).

La concentración media estimada en el ganado caprino es de 2.500 a 3.000 x 10⁶ espermatozoides/ml (Abraham, 1987; Maxwell y Evans, 1990), siendo susceptibles a variaciones estacionales, raciales e individuales (Memon et al., 1986; Corteel, 1981 ;Pérez, 1992; Cortés et al., 1994b). Las diferencias entre eyaculados son menores cuando los machos están sometidos a un ritmo periódico de recogidas.

2.1.2.2.4. Formas anormales

La morfología espermática es una de las características más estudiadas en el análisis seminal con el objetivo de eliminar aquellos individuos no aptos para la reproducción. La presencia de altos porcentajes de formas anormales parece estar

asociada con una inmadurez sexual, a procesos degenerativos y patológicos (Smith y Sherman, 1994) e incluso con un excesivo ritmo de recogida.

El porcentaje de las morfoanomalías encontradas en el semen parece ser un buen indicador de las lesiones o fisiopatologías del aparato reproductor masculino (Smith y Sherman, 1994; Pomerol y Arrondo, 1994).

El estudio de la morfología espermática ha utilizado tradicionalmente técnicas de tinción, entre las que destacamos la Eosina-nigrosina (Colas, 1980; Maswell y Evans, 1990; Smith y Sherman, 1994), cristal violeta (Carbonero, 1954; Derivaux, 1982; Abraham, 1987) y nitratos de plata (Chinoy et al., 1992). La introducción de los sistemas C.A.S.A. ha permitido realizar una evaluación morfométrica objetiva y cuantitativa del semen de diversas especies (Sancho et al., 1994; Gravance et al., 1995; Ball y Mohammed, 1995; Casey et al., 1997). Sin embargo, la fijación en suero salino formolado o en glutaraldehído al 2% en BL-1 (sin tinción previa) y posterior observación en microscopio de contraste de fases, es el método más extendido para la detección rutinaria de formas anormales en animales domésticos (Memon y Ott, 1981; Volglmayr et al., 1983; Smith y Sherman, 1994).

Un eyaculado de macho cabrío se considera normal cuando el porcentaje de formas anormales es inferior al 15% (Abraham, 1987; Maxwell y Evans, 1990). Existen variaciones en la morfología espermática debido al estrés, factor individual, temperatura, estación del año , ... (Smith y Sherman, 1994).

2.1.2.2.5. Complejo acrosómico

El acrosoma es una estructura membranosa localizada en la parte anterior de

la cabeza, recubriendo la parte superior del núcleo (Fawcett, 1975; Curry y Watson, 1995). Dicha vesícula, procedente del aparato de Golgi, es considerado como un lisosoma especializado rico en carbohidratos, hidrolasas ácidas y tripsin-proteasas (Fawcett, 1975; Carbonero y Vázquez, 1984; Brucker y Lipford, 1995).

Las alteraciones morfológicas y fisiológicas del acrosoma parecen asociarse con una baja capacidad fecundante del esperma, ya que en condiciones fisiológicas sólo los espermatozoides capaces de experimentar la reacción acrosómica en las proximidades del ovocito serán capaces de atravesar la zona pelúcida y penetra el gameto femenino (Pomerol y Arrondo, 1994; Curry y Watson, 1995).

La valoración del estado acrosomal se puede realizar mediante microscopía óptica de campo claro en muestras previamente teñidas con Giemsa (Watson, 1975; Derivaux, 1982; Way et al., 1995); microscopía de contraste de fases por inclusión de las muestras en una solución de glutaraldehído al 2% en BL-1 (Vázquez, 1980b; Carbonero y Vázquez, 1984) y microscopía electrónica (Tasseron et al., 1977; Liu y Gordon, 1994). Otras técnicas aprovechan la afinidad de ciertas lectinas (Way et al., 1995; Liu y Gordon, 1996) o anticuerpos (Fénichel et al., 1989; Cortés et al., 1994 a; Moutaffian y Parinaud, 1995) para fijarse al acrosoma y determinar su estado.

La triple tinción, descrita originalmente para semen humano (Talbot y Chacon, 1981), adaptada a distintas especies animales (Kusunoki, 1984; Vázquez et al., 1991; Garde et al., 1992 a), es ampliamente utilizada por su capacidad de distinguir la reacción acrosómica fisiológica de la degeneración secundaria a la muerte celular, observándose en microscopía óptica de campo claro a 1000x.

2.1.2.2.6. Test de permeabilidad de membrana

La prueba de permeabilidad de membrana (endósmosis ó Hipo-osmotic-swelling test (HOS test)) está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática. La inclusión de células espermáticas en una solución hipoosmótica provoca el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior del espermatozoide hasta alcanzar su equilibrio osmótico (Eckert et al., 1989), observándose cambios morfológicos a nivel de la cola. Si la membrana se encuentra dañada, o se ha vuelto altamente permeable, no se observan dichos cambios.

Cuando los espermatozoides son sometidos a un medio de elevada hipotonocidad y alcanzan su volumen crítico, la membrana plasmática se rompe y el flagelo se endereza bruscamente, pudiendo variar su morfología posteriormente desde recta a ligeramente curvada o totalmente sinuosa (Vázquez, 1980 a; Jeyendran et al., 1984; Gafo, 1992; Cortés et al., 1993).

La observación de las variaciones de volumen en la célula espermática se realiza a través de microscopía de contraste de fases, previa fijación de la muestra. La presión osmótica del medio utilizado y el tiempo requerido son característicos de cada especie (Vázquez, 1980; Jeyendran et al., 1984; Gafo, 1992; Cortés et al., 1993; Donoghue et al., 1996).

El test de permeabilidad de membrana es indicativo de la resistencia de la membrana plasmática, estando correlacionada positivamente con la fertilización de ovocitos "in vitro" en semen fresco (Hauser et al., 1992), test de hámster (Fuse et al., 1991; Garde, 1992 b), unión a anticuerpos GB24 (Cortés et al., 1994) y tinciones vitales (G^a Artiga et al., 1994). Se observan cambios en el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva tras exponer a las células espermáticas a

procesos de refrigeración, congelación, capacitación, ... (Vázquez et al., 1989; Garde, 1992 b; Donoghue et al., 1996; Correa et al., 1996 b).

2.1.2.2.7. Tinciones vitales

La viabilidad espermática depende de la integridad de la membrana plasmática y de la actividad biosintética del espermatozoide.

Actualmente existe toda una serie de técnicas destinadas a identificar espermatozoides vivos y muertos. Se han descrito numerosas tinciones basadas en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática como por ejemplo la eosina/nigrosina (Colas, 1980) y Tripán azul (Suttiyotin y Thawaiter, 1991), de tal manera que si el espermatozoide está vivo la membrana celular actúa como barrera impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse.

La introducción de la microscopía de fluorescencia en la determinación del estado vital del espermatozoide ha hecho aumentar la sensibilidad y resolución de las preparaciones destinadas a este fin, como es el caso de la utilización del naranja de acridina (Tejada, 1984; Hoshi et al., 1996) en la identificación del estado del ADN.

También se han utilizado diversas pruebas de valoración del metabolismo espermático, como son la reducción del azul de metileno, demanda de oxígeno ó índice de fructolisis (Cooper et al., 1995). Sin embargo estas mediciones representan la media de la muestra, y no tienen en cuenta las diferencias individuales entre los espermatozoides (Boixo, 1994).

2.2.2.3. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

El plasma seminal es el resultado de secreciones procedentes del testículo, epidídimo y de glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales de Cowper). En los machos ovinos y caprinos las glándulas de mayor tamaño son las vesiculares, localizadas próximas a la unión de los conductos deferentes y la uretra (Maxwell y Evans, 1990).

En el plasma seminal se encuentran componentes específicos de cada glándula, que son utilizados como marcadores bioquímicos de la función glandular (Anderson et al., 1979; Borque et al., 1989; Andolz y Bielsa, 1995; Santiago et al., 1995). Estos marcadores se agrupan según su procedencia en:

- * Vesiculares: Fructosa y prostaglandinas.
- * Prostáticos: Ácido cítrico, fosfatasa ácida, zinc y γ -glutamyltransferasa.
- * Epididimarios: L-carnitina libre y glicerofosfocolina.

La concentración de fructosa y ácido cítrico en plasma seminal están sometidas a variaciones estacionales, raciales e individuales (Chand et al., 1985; Mendoza et al., 1989; Roca et al., 1993), apreciándose diferencias en su contenido según la edad del individuo (Roca et al., 1991). Dichas concentraciones están en relación directa con la actividad de la testosterona, constituyendo por tanto, un indicador de la función endocrina del testículo (Borque et al., 1989). Se han establecido correlaciones entre los valores bajos de fructosa con pequeños niveles de movilidad y volumen (Gonzales y Villena, 1997). El ácido cítrico activa la fosfatasa ácida, manteniendo el equilibrio osmótico junto con el sodio y potasio, favoreciendo la movilidad espermática.

La proteína total presente en plasma seminal es indicador de alteraciones patológicas del aparato reproductor masculino, estando estrechamente relacionadas con la congelabilidad del semen (**Borque et al., 1989**).

La determinación de enzimas espermáticas en el plasma seminal, como la aspartato aminotransferasa (AAT), sirven de indicadores de daño celular por choque frío (**Borque et al., 1996**).

2.2. CARACTERÍSTICAS SEMINALES DEL EYACULADO DE MACHO CABRÍO.

El semen eyaculado de macho cabrío, al igual que sucede con otros mamíferos, está formado por espermatozoides y plasma seminal, compuesto por secreciones procedentes del testículo, epidídimo, deferentes, vesícula seminal, glándulas bulbouretrales y próstata. Debido a la anatomía propia de cada especie, la contribución de las glándulas accesorias al plasma seminal varía enormemente de unas a otras, encontrando diferencias considerables tanto en el volumen como en su composición (**Mann, 1975; Maxwell y Evans, 1990**).

El plasma seminal vehicula los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho durante la eyaculación hasta el tracto genital de la hembra. Es un fluido isoosmótico compuesto en un 75% por agua, llevando en disolución fructosa, ácido cítrico, sorbitol, inositol, fosfolípidos, prostaglandinas, enzimas y proteínas, además de iones inorgánicos como sodio, potasio y cloro, siendo la concentración estos dos últimos iones en el plasma seminal mayor en el macho cabrío que en morueco (**Iritani y Nishikawa, 1964**). Presenta un pH neutro sostenido por un complejo sistema tampón que protege a los espermatozoides de los cambios de pH, que afectan la supervivencia de las células espermáticas (**Abraham, 1987; Maxwell y**

Evans, 1990).

El plasma seminal caprino es rico en fosfatasa ácida y alcalina, secretadas por la próstata, y en fosfolipasa A, producida en la glándula bulbouretral o de Cowper (**Roy, 1957**). La fosfolipasa A es la enzima responsable de la coagulación de la yema de huevo, utilizada en los medios de refrigeración y congelación de semen (**Corteel, 1981**), debido su acción sobre las lecitinas de la yema de huevo, escindiendo dicha molécula en lisolecitinas y ac. grasos libres. Los productos resultantes de su actuación producen además un efecto “espermicida”, dando lugar a la inmovilización y muerte de los espermatozoides (**Corteel, 1992; Pellicer, 1996**). La fosfolipasa A se activa en presencia de iones calcio, disminuyendo su acción cuando en el medio aparecen citratos u oxalatos (**Roy, 1957**).

La concentración de fosfolipasa A varía individualmente entre los diferentes machos cabríos, siendo más alta cuando el semen es obtenido mediante electroeyaculación (**Maxwell y Evans, 1990**). Es suficiente la presencia de un 2,5 % (v/v) de plasma seminal de macho cabrío en un medio con yema de huevo para producir su coagulación (**Salamon y Ritar, 1982**).

El efecto tóxico de la fosfolipasa A se ve reducido al eliminar el plasma seminal ó al utilizar semen procedente de machos cabríos cowperectomizados (**Iritani y Nishikawa, 1962**). El lavado mediante centrifugación del semen con el objetivo de eliminar el plasma seminal permite reducir la concentración de fosfolipasa, reduciendo el efecto tóxico sobre los espermatozoides (**Corteel, 1980; Ritar y Salomon, 1982; Nunes et al., 1982; Corteel, 1992; Pellicer, 1996**). Sin embargo, la eliminación del plasma seminal implica el descenso de los niveles de fructosa, ác. cítrico y zinc (estabilizadores del metabolismo espermático) así como de los factores de decapitación, y por tanto induce una capacitación prematura. La utilización de concentraciones de yema de huevo menores al 2 % no producen el fenómeno de

coagulación (Maxwell y Evans, 1990).

Chauhan y Anand (1990) determinaron la concentración de fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina antes y después de la congelación de semen caprino en un diluyente con yema de huevo, no observando su hidrólisis en lisofosfolípidos y ácidos grasos. En base a sus resultados, aconsejan la congelación de dosis seminales en diluyente citrato-glucosa-yema de huevo sin necesidad de eliminar el plasma seminal.

Tuli y Holtz (1994) observaron una mayor liberación de la enzima GOT (Glutámico oxalacético transaminasa) y menor movilidad e integridad espermática en semen descongelado con centrifugación previa a su congelación. Resultados similares obtienen **Roca et al. (1994)**, observando una evolución similar en los parámetros seminales (calidad de movimiento, vitalidad y acrosomas normales) utilizando un Tris-yema con un 18% y 2,5% de yema de huevo para semen lavado y sin lavar respectivamente, obteniendo un 76% de fertilidad con semen refrigerado sin lavar en la raza Murciano-Grandina. **Soria (1995)** observó un descenso en la capacidad de supervivencia de los espermatozoides de macho cabrío tras el lavado de la muestra seminal, obteniendo los mejores resultados en un diluyente TesT-Caseína con un 9% de yema de huevo.

La influencia de la raza, edad, temperatura y fotoperíodo sobre la calidad seminal del macho cabrío y por consiguiente sobre la congelabilidad de los eyaculados, han sido estudiados por diversos autores, siendo el fotoperíodo el factor de mayor influencia (**Corteel et al., 1980; Pérez , 1992; Herrera y Tapia, 1995; Pérez y Mateos, 1996**). En zonas templadas situadas en latitudes comprendidas entre 40°-50°, la estación sexual se ve limitada a los meses de otoño-invierno, reflejándose sobre la libido, producción seminal y calidad de los eyaculados (**Corteel, 1981; Roca et al., 1989; Pérez , 1992; Pérez y Mateos, 1996**). En nuestro laboratorio, y según se indica en la **Tabla 1**, hemos encontrado valores diferentes según la raza y estación.

Tabla 1.- Características seminales de eyaculados de macho cabrío de diferentes razas según la estación anual. (*Datos recogidos por el Laboratorio de Criobiología del Área de Reproducción Animal (CIT/INIA, Madrid) durante 1994, 95 y 96).

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
<i>Raza Saanen (Ahmad y Noakes, 1996)</i>				
Volumen (ml)	0.87	0.60	0.40	0.42
Concentración ($\times 10^6$)/ml	4370	4240	5510	5930
Espz. Móviles (%)	79.7	76.3	72.7	65.5
<i>Raza Malagueña *</i>				
Volumen (ml)	0.75	1.21	1.30	0.85
Concentración ($\times 10^6$)/ml	5543	4618	4699	5447
Espz. Móviles (%)	74.6	78.6	84.2	78
<i>Raza Murciano-Granadina *</i>				
Volumen (ml)	0.60	0.76	0.90	0.70
Concentración ($\times 10^6$)/ml	4735	3824	3580	5632
Espz. Móviles (%)	73.0	79.9	78.8	63.4
<i>Raza Jamunapari (Sahni y Tiwari, 1992)</i>				
Volumen (ml)	0.84	1.02	0.73	0.72
Concentración ($\times 10^6$)/ml	2210	1805	1986	3309
Espz. Móviles (%)	-	-	-	-
<i>Raza Verata (Pérez, 1992)</i>				
Volumen (ml)	0.48	1.02	1.01	0.69
Concentración ($\times 10^6$)/ml	6863	3938	3780	3809
Espz. Móviles (%)	67.0	78.2	76.0	73.8

El fotoperíodo no sólo afecta a la producción seminal, sino que también tiene repercusión sobre la composición del plasma seminal debido a la regulación que ejercen los andrógenos en circulación sobre la actividad de las glándulas sexuales accesorias (Tresguerres, 1989), observándose un efecto menos negativo sobre los espermatozoides en época de reproducción que fuera de ella (Nunes et al., 1982).

Las razas que presentan una marcada estacionalidad sexual poseen una secreción de testosterona condicionada por la estación del año, produciéndose un incremento en la frecuencia de pulsos de LH, lo que provoca un incremento en la secreción de testosterona por el testículo, así como un aumento del tamaño testicular (Lincol., 1988; Tresguerres, 1989). La secreción de testosterona es mayor en la época de fotoperíodo decreciente (verano y otoño) que durante el fotoperíodo creciente (invierno y primavera).

2.3. CONSERVACIÓN DEL SEMEN CAPRINO

La I.A. en ganado caprino es una técnica poco utilizada en nuestro país, limitándose prácticamente su uso a la utilización de semen fresco y refrigerado, y experimentalmente con semen congelado (Herrera et al., 1994). Sin embargo, los logros conseguidos en ganado ovino (Anel, 1994) y los avances conseguidos en el caprino (Amoah y Gelaye, 1997) han animado a los ganaderos, especialmente a los del sector lechero, a ampliar sus perspectivas de futuro, necesitando la utilización de la I.A. como técnica imprescindible para mejorar la producción individual.

Una de las grandes ventajas que presenta la I.A. es la utilización de sementales de gran valor genético para inseminar un número mayor de hembras que las que podrían cubrir por monta natural (Maxwell y Evans, 1990), debido a que tras la dilución del semen se consigue un aumento del volumen del eyaculado, obteniendo un mayor número dosis seminales.

La conservación del semen mediante refrigeración (+15°C ó +5°C) o congelación tiene como objetivo fundamental la prolongación de la viabilidad de los gametos masculinos, durante horas/días o indefinidamente, ya que a temperatura ambiente los espermatozoides degeneran con cierta rapidez debido, principalmente, al agotamiento de

las reservas energéticas.

La selección del semen previa refrigeración o congelación de los mismos, proporciona dosis seminales con calidad inicial suficiente para ser utilizadas independientemente de la estación del año en que hayan sido obtenidas (**Roca et al., 1992; Aguado et al., 1994**). El semen eyaculado debe cumplir una serie de valores mínimos (volumen, concentración y movilidad) que indiquen la conveniencia de aceptarlos para su posterior conservación.

2.3.1. DILUCIÓN

La dilución de los eyaculados tiene como objeto aumentar el volumen y mantener una concentración espermática adecuada para dar servicio al mayor número posible de hembras. El título de dilución depende tanto del volumen de inseminación (varía en función del tipo de inseminación: vaginal, cervical, intrauterina) como de la concentración de espermatozoides móviles con la que queremos inseminar, ya que independientemente del lugar de la inseminación, el número de espermatozoides móviles esta correlacionado con la fertilidad (**Maxwell y Evans, 1990; Ritar et al., 1990**).

La dilución aconsejada en semen caprino varía enormemente entre autores. Algunos investigadores obtienen mejores resultados con títulos de dilución 1:10 mejor que 1:1 (**Memon y Ott, 1981; Ritar et al., 1990; Sahni y Tiwari, 1992; Ritar y Ball, 1993**), existiendo otros trabajos que apuntan a las diluciones superiores a 1:1 como las responsables de un descenso de la fertilidad (**Salamon y Ritar, 1982; Park et al., 1989**). La bibliografía no parece aconsejar diluciones superiores a 1:5 de los eyaculados destinados a la elaboración de dosis seminales incluidas en programas comerciales de I.A..

2.3.2. DILUYENTES

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados en la conservación del semen de macho cabrío. Sin embargo, todos los medios empleados para este fin, prolongan la viabilidad de la célula espermática por un período limitado de tiempo (refrigeración) o indefinidamente (congelación), rentabilizando en cualquier caso el número de dosis obtenidas por eyaculado.

Los diluyentes empleados en la conservación de células espermáticas deben cumplir una serie de condiciones (Fiser et al., 1981; Abdelhakeam et al., 1991; Pérez Fuentes et al., 1993; Garde et al., 1995):

1. Ser isotónico con el plasma seminal (320 mOsm/kg) cuando es utilizado en refrigeración, e hiperosmótico (400 mOsm/Kg) en congelación.
2. Poseer un pK próximo a 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación.
3. Contener moléculas que protejan a los espermatozoides frente al frío, clasificadas en función de su capacidad de atravesar la membrana plasmática en: sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes.
4. Contener en su constitución una fuente de energía, siendo la glucosa y fructosa las más utilizadas.
5. Estar libre de bacterias y contaminación, para lo cuál se utilizan antibióticos en su composición.

6. Aumentar el volumen substancialmente con el fin de poder realizar múltiples inseminaciones.

El *pH* óptimo de los diluyentes empleados en la conservación espermática se mantiene en torno a la neutralidad (**Vázquez et al., 1986; Dunner, 1991**), siendo necesaria la presencia de soluciones tampones para su mantenimiento. Los tampones deben tener un *pK* entre 6 y 8 (preferiblemente 7), máxima solubilidad en agua, han de atravesar selectivamente la membrana plasmática, reducir el efecto de la concentración de sales, tener propiedades quelantes, ser estables y resistir la degradación enzimática (**Graham, 1978**). Si bien las soluciones tampones más comúnmente empleadas son el citrato, fosfato y bicarbonato sódico, estudios más recientes muestran los compuestos zwitteriónicos ó amido-orgánicos como el BES, TES, TRIS, HEPES, MES y PIPES con mayor capacidad estabilizadora (**Graham, 1978 b; Vázquez et al., 1988; Duner, 1991; Molina et al., 1996**).

Los azúcares presentes en los diluyentes ejercen un efecto positivo sobre la viabilidad espermática debido a su aporte energético al espermatozoide (**Maxwell y Evans, 1990**) (son capaces de metabolizar glucosa, fructosa, manosa y arabinosa ,esta última por vía oxidativa) y a su acción como crioprotectores (**Molina et al., 1990; Dunner, 1990**), contribuyendo a mantener el equilibrio osmótico.

Otra particularidad de los medios para la conservación espermática es la presencia de crioprotectores. Dichas moléculas, de características bien definidas en cuanto a tamaño y permeabilidad, protegen las estructuras celulares frente a las bajas temperaturas, siendo beneficiosa su adición en refrigeraciones a bajas temperaturas +5°C, y necesaria en la congelación. Los crioprotectores pueden clasificarse atendiendo al grado de actividad de paso sobre la membrana plasmática en:

Crioprotectores no penetrantes: Son aquellos que al ser incorporados en el medio de dilución recubren la membrana plasmática del espermatozoides protegiendo su estructura de la acción del frío. En ningún atraviesan la membrana espermática debido a su alto peso molecular o especificidad. Destacan por su utilización los azúcares (glucosa, lactosa y fructosa), las proteínas de la leche descremada y yema de huevo (**Corteel, 1981; Maxwell y Evans, 1990; Salamon y Maxwell, 1995**).

Crioprotectores penetrantes: Son aquellos capaces de penetrar en la célula de forma uniforme evitando el estrés osmótico, produciendo deshidratación celular por la sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de la concentración de solutos del medio extracelular e impidiendo la formación de cristales de hielo en el interior. Destaca por su utilización el glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propilen-glicol, etilen-glicol, metanol y etanol (**Deka y Rao, 1985 a; Singh et al., 1996 a; Singh et al., 1995; Salamon y Maxwell, 1995**).

La adición de antibióticos a los distintos diluyentes es opcional si bien, se recomienda su utilización como forma de control de la población de gérmenes presentes en el eyaculado. Los antibióticos más utilizados son la penicilina G-sódica y el sulfato dihidro-estreptomicina.

2.3.3. DILUYENTES DE REFRIGERACIÓN

Los diluyentes de refrigeración son soluciones acuosas tamponadas a las que se les añade una fuente de energía (glucosa, fructosa, ...) y un crioprotector no penetrante,

que es opcional dependiendo de la temperatura y tiempo de refrigeración (leche descremada, yema de huevo, ...). Algunos diluyentes de refrigeración incorporan antioxidantes o agentes quelantes de manera experimental, observándose un aumento en el porcentaje de fertilización "in vitro" en los diluyentes que incorporan en su composición SOD (superóxido dismutasa) y catalasa (Hammerstedt, 1993).

Los diluyentes han de preservar la viabilidad espermática a una temperatura de +15 °C ó +5 °C durante un mínimo de 6 horas. Tiempos mayores de refrigeración implican un beneficio para el inseminador, posibilitando un aumento del área de trabajo y facilitando el manejo en general y facilitando el manejo en general.

2.3.3.1. LECHE DE VACA

Debido a las características seminales del macho cabrío anteriormente citadas, la utilización de leche de vaca es un diluyente ampliamente utilizado. La leche de vaca puede emplearse tanto entera, descremada, UHT o en polvo para reconstruir, siendo esta última la más universal. Excepto en el caso de la leche UHT, las demás formas de leche han de ser calentadas hasta una temperatura de +92°/+95 °C durante 8-10 minutos, sin llegar a hervir (tindalización), con el objetivo de anular los factores tóxicos de su fracción proteica (Maxwell y Evans, 1990).

El diluyente a base de leche descremada reconstituida más utilizado en la refrigeración de semen caprino es el de Corteel (1981), con buenas propiedades conservantes a una temperatura de +15 °C, aunque se muestra ineficaz a +5°C (Guérin, 1990), siendo de complicada elaboración y conservación.

2.3.3.2. YEMA DE HUEVO

La otra gran alternativa como crioprotector externo a la leche de vaca la constituye la yema de huevo de gallina. Los huevos han de ser frescos, no transcurriendo más de 4 días desde la puesta hasta el momento de su utilización (**Maxwell y Evans, 1990**). En el caso de no disponer de huevos frescos se puede utilizar yema de huevo desecada para la realización de los diluyentes (**Montero et al., 1995**).

La concentración de yema de huevo utilizada en la conservación de semen caprino es menor que en otras especies (ovino, porcino, ...) debido a las propiedades antes indicadas de la fosfolipasa A₂, que en presencia de calcio es capaz de hidrolizar las lecitinas de la yema de huevo en lisolecitinas y ácidos grasos libres. La cantidad de yema de huevo utilizada varía según los autores (**Tabla 2**), siendo las concentraciones mayores utilizadas tras la eliminación del plasma seminal.

Tabla 2.- Concentración de yema de huevo utilizada por distintos autores para la refrigeración de semen caprino.

Diluyente	Yema de huevo (%)	Referencia
Tris Glucosa	1.5-12	Ritar y Salamon, 1982
Tris Cítrico Glucosa	1.5-2.2	Ritar et al., 1990
Tris Fructosa	10	Azawi et al., 1993
Tris Cítrico Fructosa	5	Stojanov et al., 1994
Tris	2.5-18	Roca et al., 1994

La incorporación de la yema de huevo se realiza sobre el volumen final del diluyente base, homogeneizándose adecuadamente. Para la eliminación de las partículas groseras se procede a la centrifugación del diluyente a 500 g durante 35 minutos.

2.3.3.3. AGUA DE COCO

La utilización del agua de coco como diluyente se presenta como un método alternativo en la conservación del semen caprino. Dentro de las alternativas de los diluyentes pobres en fosfolípidos, se ha demostrado que el agua de coco favorece la conservación del semen caprino (Nunes, 1993 a). La movilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos en semen caprino refrigerado a +4°C con agua de coco son significativamente superiores a los obtenidos con leche. La supervivencia espermática, esta alrededor de las 60 horas en agua de coco frente a las 12 horas en un medio de leche (Nunes, 1993 a), observándose un aumento de la fertilidad en las cabras inseminadas con agua de coco frente a las inseminadas con leche así como un mayor número de nacimientos de hembras (Nunes, 1993 a).

La utilización de la leche de coco como diluyente de conservación en semen caprino está menos extendido debido a su mayor contenido en fosfolípidos (Nunes 1993 b), si bien se han encontrado resultados satisfactorios tras su utilización (Balakrishnan y Neelakanta, 1982).

2.3.4. DILUYENTES DE CONGELACIÓN

La posibilidad de almacenar dosis seminales por un período indefinido de tiempo para su posterior utilización, es una de las mayores ventajas que presenta la congelación dentro de los programas de I.A.

Las causas de mayor mortalidad espermática durante la congelación se deben al aumento de la concentración de sales, formación de cristales de hielo en el interior del espermatozoide, cambios en el pH, desnaturalización de proteínas y rotura mecánica de elementos estructurales, durante el proceso del cambio de estado. La protección de los

espermatozoides durante el descenso de temperatura durante la congelación se consigue mediante la incorporación de crioprotectores al diluyente base, tan y como se indicó en el apartado de diluyentes (**Deka y Rao, 1985 a; Singh et al., 1995; Salamon y Maxwell, 1995**).

El glicerol es el crioprotector penetrante más ampliamente utilizado debido principalmente a su capacidad “tampón” con las sales, minimizando el daño electrolítico y la formación de cristales de hielo (**Deka y Rao, 1985 a; Salamon y Maxwell, 1995**).

La adición del glicerol en función de la concentración espermática muestra los mejores resultados post-descongelación (**Salamon y Ritar, 1982**). Si bien, existen otros crioprotectores utilizados en la congelación espermática como el DMSO o etilen-glicol, es el glicerol el que manifiesta unos resultados post-descongelación superiores resultados (**Deka y Rao, 1985 a; Singh et al., 1996; Singh et al., 1995; Salamon y Maxwell, 1995**).

La concentración de glicerol empleada en la preparación de los diluyentes varía según los autores, manteniéndose entre el 3 y 11% (**Tabla 3**). Dicha variabilidad depende principalmente del diluyente base empleado y su sistema de dilución, así como de la temperatura a la cuál se añade dicho diluyente glicerolado (**Tuli y Holtz, 1994**).

En general, los mejores resultados post-descongelación se obtienen tras la utilización de concentraciones intermedias de glicerol (4 y 6%) (**Deka y Rao, 1986; Sinha et al., 1992; Tuli y Holtz, 1994**). Las concentraciones de glicerol utilizadas en semen ovino también oscilan en este rango, si bien en ovino se puede llegar a anular su adición tras un aumento del porcentaje de la yema de huevo hasta el 30% (**Abdelhakeam et al., 1991; G^a Artiga et al., 1993**).

Tabla 3.- Porcentaje de glicerol utilizado por diversos autores en los diluyentes de congelación de semen caprino.

% Glicerol	Diluyente	Referencia
3-11	Cítrico Glucosa*	Chauhan et al., 1994
4	Tris Glucosa*	Pérez y Mateos , 1994
4	BesKOH*	Duner, 1991
4	Tris Cítrico Glucosa*	Ritar y Ball, 1993
4	Leche descremada	Sinha et al., 1992
6	Tris Cítrico Glucosa*	Ritar et al., 1990
6	Tris Cítrico Glucosa*	Ritar y Salamon, 1982
7	Tris Glucosa*	Watson, 1975
8	Tris Cítrico Fructosa*	Berger, 1989
8	Tris Glucosa*	Sing et al., 1995

(*) Diluyentes con yema de huevo.

La adición del glicerol se puede realizar en una o varias etapas (Corteel, 1975; Deka y Rao, 1985 b; Salamon y Maxwell, 1982; Tuli y Holtz, 1994; Salamon y Maxwell, 1995), y a una temperatura de +37°C, +22°C o +5°C. El efecto tóxico del glicerol es menor si se añade a +5°C, sin embargo, la velocidad de penetración también es menor, por lo que se habrá de aumentar el tiempo de equilibración (Corteel, 1975). La adición del glicerol a temperatura ambiente permite una penetración más rápida del agente, si bien ejerce una acción mas tóxica sobre los espermatozoides al estar mas tiempo en contacto con los mismos (Salamon y Ritar, 1982; Salamon y Maxwell, 1995).

La mayoría de los medios utilizados para la crioconservación espermática son hipertonicos con respecto al plasma seminal (Fiser et al., 1981). El aumento de la P.O. de los medios facilita la salida de agua al medio extracelular con el fin de equilibrar las

concentraciones a ambos lados de la membrana plasmática, produciendo un mayor grado de deshidratación en el espermatozoide y por consiguiente reduciendo la formación de hielo en su interior, obteniendo unos resultados mejores tras la descongelación (Fiser et al., 1981).

Al igual que ya ocurriera en los diluyentes de refrigeración, algunos medios de congelación muestran en su composición antioxidantes como crioprotectores, si bien esta faceta continua en investigación (Stajanov et al., 1994).

2.3.5. REFRIGERACIÓN DE SEMEN CAPRINO

La refrigeración implica un descenso de temperatura del eyaculado desde los +30°C (temperatura de dilución) hasta los +15 °C ó +5 °C (temperaturas de conservación óptimas), siendo la temperatura de refrigeración utilizada inversamente proporcional al tiempo de conservación (Vázquez et al., 1986). El descenso de la temperatura ha de realizarse de forma suave y progresiva.

El período de refrigeración del semen caprino esta en función de la temperatura, método y diluyente empleado, oscilando entre 2 y 126 horas según los diversos autores (Corteel, 1981; Guérin, 1990; Sahni y Tiwari, 1992; Nunes, 1993 a). Sin embargo, el descenso de la viabilidad espermática observada a lo largo del tiempo solo hace posible la inseminación con eyaculados refrigerados durante 6-10 horas.

2.3.6. CONGELACIÓN DE SEMEN CAPRINO

La utilización de dosis seminales congeladas y su posterior aplicación en I.A. es un requisito obligatorio dentro de programas de selección de una raza. La difusión de

material genético mejorante sin límite geográfico (debido a su fácil transporte) ni de tiempo, hacen que esta técnica sea imprescindible.

Los resultados de fertilidad obtenidos con semen congelado son inferiores a los encontrados en semen refrigerado, existiendo grandes variaciones dependiendo de la composición del diluyente, calidad inicial del semen y su tratamiento, lugar de deposición de la dosis, momento de la inseminación, número de inseminaciones, tipo de sincronización, estación del año y raza (Corteel, 1975; Moore et al., 1989; Chauhan y Anand, 1990; Ritar y Ball, 1993; Sinha et al, 1995).

La utilización de dosis descongelación de semen caprino en programas de I.A. viene desarrollándose desde hace muchos años de manera experimental con mayor o menor éxito (Tabla 4), siendo las referencias encontradas de su aplicación industrial escasas fuera de nuestras fronteras y prácticamente nulas en nuestro país.

Tabla 4.- Fertilidades obtenidas con semen caprino refrigerado y congelado.

FERTILIDAD (%)	TÉCNICA	REFERENCIA
40.5	Semen Descongelado	Corteel, 1975
55	Semen Descongelado	Singh et al., 1995
56,8	Semen Descongelado	Ritar y Ball, 1993
58,8	Semen Descongelado	Sinha et al, 1995
68	Semen Refrigerado	Nunes, 1993 a
81	Semen Descongelado	Chauhan y Anand, 1990

La congelación de las dosis seminales se puede realizar en vapores de nitrógeno líquido (NL), sobre nieve carbónica o mediante biocongeladores (con rampas de velocidad programadas). Las formas mas utilizadas en la congelación del semen son las

pajuelas de 0,25 ml y 0,50 ml, criotubos de 1,0 ml, píldoras de 0,1 ml y ampollas de cristal de 1,5 ml, existiendo discrepancias entre autores sobre el envase de mayor efectividad (Maxwell et al., 1980; Pontbriand et al., 1989; Ritar et al., 1990; Vázquez et al., 1991; Sahni y Tiwari, 1992).

El descenso de temperatura desde +30°C hasta +5°C ha de realizarse lentamente, ya que la bajada rápida de temperatura o "cold shock" produce daños celulares irreparables debido principalmente, a cambios en la viscosidad de los fluidos, en la solubilidad de los gases, así como metabólicos y químicos (Darin-Bennet y White, 1977; Robertson y Watson, 1986; Robertson et al., 1990). Este período de enfriamiento tiene una duración aproximada de 1 a 2 horas (-0,1°C/min o -0,5°C/min) dependiendo de la técnica que se utilice de congelación (Memon y Ott, 1981). Sin embargo, una bajada demasiado lenta de temperatura prolongaría una alta actividad metabólica, lo que conlleva a una muerte celular prematura.

No se ha establecido de manera uniforme el tiempo óptimo de equilibración, período comprendido desde que se añade el glicerol hasta que el semen es congelado (Graham, 1978), aunque depende en gran medida de la composición del diluyente y técnicas utilizadas (Deka y Rao, 1986; Sahni y Tiwari, 1992; Sinha et al., 1992; Pérez y Mateos, 1994; Salamon y Maswell, 1995).

Cuando las soluciones se enfrían gradualmente por debajo del punto de congelación, se produce un superenfriamiento de la célula y del medio exterior a temperaturas de -5°C (Watson, 1990). Entre -5°C y -15°C se produce el punto crioscópico de fusión, aumentando la concentración de solutos en el medio. El interior de la célula sigue superenfriado debido al bloqueo del crecimiento de los cristales de hielo por la membrana plasmática, produciéndose un desequilibrio osmótico entre los medios intracelular y extracelular (Mazur, 1980), produciéndose un flujo neto de agua hacia el exterior de la célula en respuesta al desequilibrio.

La temperatura crítica de congelación oscila entre los -10°C y -15°C , dado que entre dichas temperaturas se produce la formación de cristales de hielo y el efecto solución (incremento de la concentración de solutos, cambios en el pH, precipitación de solutos, aumento de la deshidratación y descenso del volumen del fluido) (Mazur, 1990; Watson y Duncan, 1988).

2.3.6.1. DESCONGELACIÓN DE DOSIS SEMINALES

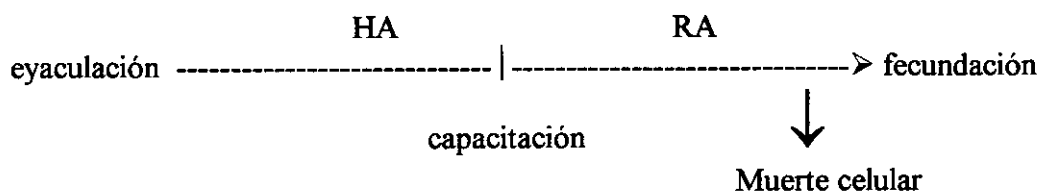
La temperatura y tiempo de descongelación varía dependiendo del tipo de envase elegido (Salamon y Maxwell, 1995), no existiendo uniformidad de criterios entre los diferentes autores para un mismo envase, si bien se ha demostrado que las descongelaciones a altas temperaturas durante escasos segundos muestran mejores resultados (Fiser et al., 1981; Pontbriand et al., 1989; Ritar et al., 1990; Tuli et al., 1991; Salamon y Maxwell, 1995; Correa et al., 1996 b).

La viabilidad de las dosis descongeladas va a ser un sumatorio de los procesos de dilución, refrigeración, glicerolización, congelación y descongelación, cuyo resultado final es una pérdida de movilidad, vitalidad, morfoanomalías, acrosomas, permeabilidad de membrana ..., y por consiguiente de la fertilidad (Deka y Rao, 1985 b; Chauhan et al., 1994, Correa et al., 1996 b).

2.4. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

En condiciones fisiológicas los espermatozoides eyaculados de mamíferos no reúnen las condiciones adecuadas para fecundar el ovocito, debiendo experimentar una serie de cambios estructurales y fisiológicos antes de adquirir dicha capacidad. Este proceso ocurre "in vivo" en el tracto genital de la hembra, y se conoce con el nombre de

"capacitación espermática" (Austin, 1952; Chang, 1951). Estas modificaciones habilitan la célula espermática para sufrir la reacción acrosómica (RA) mediante cambios a nivel de membrana que facilitan la penetración de las cubiertas del ovocito. Al iniciarse el proceso de capacitación, el espermatozoide adquiere una hiperkinesis caracterizada por un batido de flagelo más vigoroso y una mayor amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (hiperactivación, HA).



La capacitación se realiza de manera secuencial sobre la población espermática (Mendoza, 1996; Dobrinski et al., 1997). La adquisición del estado "capacitado" es más rápido "in vivo" que "in vitro", posiblemente debido a las múltiples interacciones bioquímicas entre los espermatozoides y el tracto reproductor de la hembra (Mortimer, 1995).

El lugar de deposición del semen durante la cubrición, característico de cada especie, condiciona el momento del inicio de la capacitación espermática así como el tiempo requerido para completarla (Tabla 5) (Cummins, 1995). En especies de deposición uterina (porcino y roedores de laboratorio), la capacitación y almacenamiento espermático se produce en el itsmo oviductal (Dobrinski et al., 1997). En especies de deposición vaginal (ovino, caprino, conejo, ...) la capacitación comienza durante el contacto de los espermatozoides con el moco cervical. En estos animales, las criptas presentes en el tracto cervical suponen un reservorio de espermatozoides con

capacidad fertilizante (Hunter et al., 1980; Hunter et al., 1982; Mortimer, 1995).

Tabla 5.- Tiempo de capacitación "in vivo" e "in vitro" de los espermatozoides recuperados de la región caudal del epidídimo o eyaculados (Cummins, 1995).

Especie	"In vivo"		"In vitro"	
	espz. Epididimo (Horas)	espz. Epididimo (Horas)	espz. eyaculado (Horas)	
Hombre			2	
Ratón		1.5 - 2		
Hámster	4 - 6	3		
Rata		4		
Verraco	1.5 - 3		> 4	
Toro	8		> 6	
Morueco	2		> 5	
Conejo	6 - 8	> 6	6 - 8	
Cobaya		10 - 12		

El transporte de espermatozoides desde el lugar de deposición hasta el ovocito se realiza combinando el movimiento activo desarrollado por las propias células espermáticas con movimientos peristálticos del tracto reproductor de la hembra.

2.4.1. MEMBRANA ESPERMÁTICA

Las membranas biológicas de las células de mamífero están construidas bajo un patrón común, conteniendo en su estructura proteínas, lípidos (principalmente fosfolípidos), colesterol y glúcidos. Constan de una bicapa de fosfolípidos como unidad

estructural básica. El porcentaje y la naturaleza de las proteínas adheridas a esta bicapa depende del tipo de membrana **(Darnell et al., 1988)**. La proporción de fosfolípidos, proteínas y glúcidos presentes en la membrana plasmática de las células espermáticas es característica de cada especie, **(Darnell et al., 1988; Jimenez Cabras, 1995)** y varía dependiendo del estado fisiológico en el que se encuentre **(Curry y Watson, 1995; Lin y Kan, 1996; Kan y Lin, 1996)**.

Todos los espermatozoides de mamífero poseen una membrana plasmática continua dividida en cabeza y cola. La membrana que recubre la porción cefálica se puede considerar a su vez en tres regiones: 1) membrana que recubre la región acrosomal, por donde dará comienzo la vesiculación y fusión durante la reacción acrosómica; 2) zona ecuatorial, lugar donde las membranas acrosomal y plasmática se fusionan durante la reacción acrosómica; y 3) región post-acrosómica. La membrana que protege el flagelo presenta dos dominios: 1) pieza intermedia, y 2) pieza principal **(Curry y Watson, 1995)**. Todas estas regiones de la membrana plasmática se diferencian entre si por la afinidad selectiva de su unión con lectinas **(Berger, 1990; Jimenez Cabras, 1995)**, reflejando diferencias en la composición de su glucocalix.

La membrana plasmática del espermatozoide está sujeta a cambios en su composición durante su paso por el epidídimo **(Sundhey et al., 1992)**, en el momento de la eyaculación (interacciones específicas con compuestos procedentes de las distintas glándulas accesorias) y en el transcurso de la capacitación **(Curry y Watson, 1995; Nolan y Hammerstedt, 1997)**.

Durante la capacitación, el gameto masculino experimenta numerosas modificaciones bioquímicas debido a múltiples interacciones con diversos componentes presentes en los fluidos del tracto genital de la hembra que deben realizarse hasta alcanzar el complejo cummulus-ovocito. Como respuesta a un sistema de señalización (ya sea procedente del ovocito o de agentes capacitantes) se produce un aumento de la

permeabilidad de la membrana plasmática, en los niveles de calcio intracelular y del intercambio de fosfatidil-inositol, así como un descenso de la actividad ATP-asa, redistribución de proteínas dependientes de calmodulina, y cambios en la composición lipídica de la membrana (Langlais et al., 1988; Fraser, 1992; Roldan, 1994). Se produce un incremento de fosfolípidos, debido al descenso en la proporción de colesterol/fosfolípidos dentro de la membrana (Davis et al., 1980; O'Rand, 1982; Go y Wolf; 1985), de la cantidad de fosfatidil-colina (Evans et al., 1980) y fosforilación proteica.

El proceso de capacitación es reversible durante la hiperactivación, lo cual implica la existencia en el medio donde están vehiculizados los espermatozoides de sustancias decapacitantes, como el colesterol, capaz de modificar la fluidez de la bicapa lipídica. Los agentes presentes capaces de estimular su pérdida se definen como factores capacitantes (Fayrer-Hosken et al., 1987; Cross, 1996).

El incremento de la fluidez de la membrana plasmática favorece el movimiento de proteínas y receptores, permitiendo la transducción de señales y la interacción entre los dos gametos (Roldan, 1994; Fusi et al., 1996; Nolan y Hammerstedt, 1997). Estas migraciones proteicas permiten la formación de pequeños "parches" precursores de la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. Se produce un descenso del peso molecular en algunas proteínas de origen epididimario incorporadas en la membrana plasmática y en proteínas estructurales como consecuencia de la pérdida de residuos glucídicos (Fournier-Delpech y Thibault, 1993).

Estudios comparativos realizados en distintas especies muestran la existencia de una relación entre el tiempo de capacitación y el contenido de colesterol/fosfolípidos presente en la membrana del espermatozoide (Davis et al., 1980), siendo este proceso dependiente de la concentración de albúmina en el medio.

El descenso de los niveles de colesterol en la membrana espermática está relacionada con la presencia de proteínas captadoras de esteroides en el tracto reproductor de la hembra (Go y Wolf, 1985; Davis et al., 1980). Debido a la menor concentración de colesterol en las células uterinas, los espermatozoides presentes en útero experimentan un gradiente negativo de colesterol hacia el exterior, induciendo la capacitación espermática (Fig. 3).

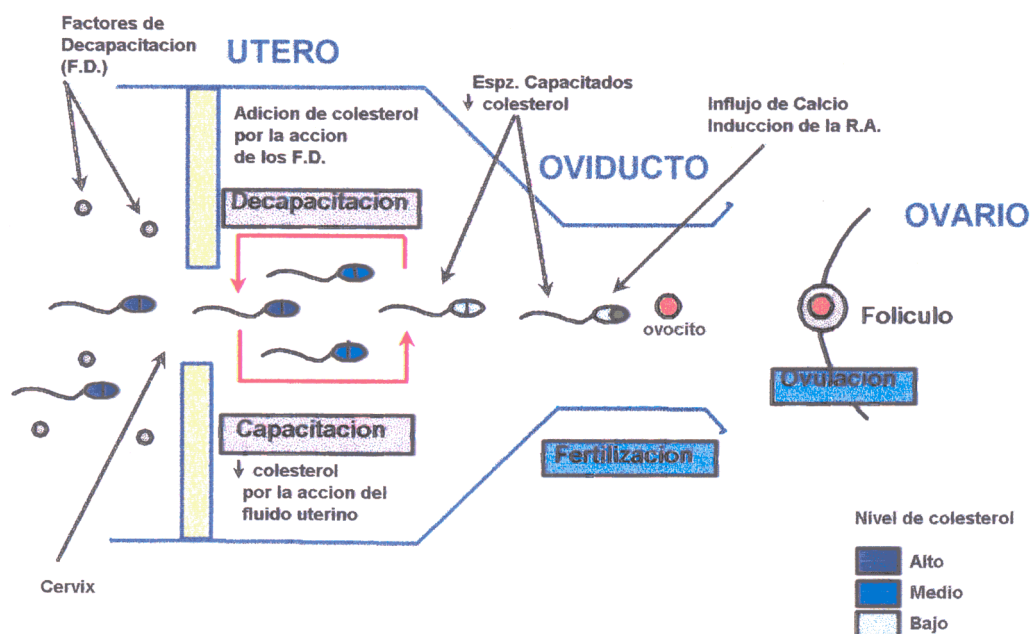


Fig.3.- Cambios en los niveles de colesterol durante la capacitación y fertilización de espermatozoides de mamífero en el tracto reproductor de la hembra.

La alta concentración de colesterol unido a HDL (High Density Lipoprotein) y albúmina, indican cierto grado de especificidad de estos aceptores, siendo la albúmina presente en el líquido folicular capaz de unir de 2 a 3 veces más cantidad de colesterol que la presente en el suero sanguíneo (Langlais et al., 1988). El aumento de la afinidad de la albúmina por el colesterol se acentúa en presencia de bicarbonato (Harrinson et al., 1994); siendo este compuesto (bicarbonato/CO₂) esencial durante la capacitación (Shi et al., 1995; Harrinson et al., 1994).

La activación de la fosfolipasa A₂ ha sido descrita como uno de los mecanismos implicados en el comienzo de la capacitación espermática y reacción acrosómica, debido a que el producto de su actividad, la lisofosfatidilcolina (LFC), desestabiliza la membrana biológica. Al inicio de la capacitación el contenido de LFC en la membrana es muy bajo, por lo que la estimulación de la fosfolipasa no se produciría durante este período, sino momentos después (Fournier-Delpech y Thibault, 1993), en respuesta del mantenimiento del proceso de hipercinesis e iniciarse la reacción acrosómica.

2.4.2. REGULACIÓN IÓNICA DURANTE LA CAPACITACIÓN

Las modificaciones en la composición y estructura de la membrana plasmática como consecuencia del inicio de la capacitación, inducen cambios en la permeabilidad de iones implicados no solo en dicho proceso, sino también durante la hiperactivación y reacción acrosómica.

La selección de medios de cultivo adecuados para la inducción de la capacitación espermática "in vitro" ha permitido el estudio de los diferentes mecanismos implicados en la adquisición de la capacidad fecundante.

2.4.2.1. IONES CALCIO

Los trabajos que demuestran la relación existente entre los iones Ca²⁺ y la capacitación espermática son muy numerosos. Desde que Loeb en 1915 demostrara la necesidad de Ca²⁺ extracelular para aumentar la fertilidad en estrellas de mar, numerosos investigadores han confirmado dicha necesidad también espermatozoides de mamíferos (Iwamatsu y Chang, 1971; Anand et al., 1989). La necesidad de presencia de iones de calcio es menor al inicio de la capacitación que durante la reacción acrosómica (Fraser,

1987; Thomas y Meizel, 1988;). Durante la capacitación se produce un incremento de la movilidad espermática ó "hiperactivación" que precede a las modificaciones en la membrana del espermatozoide (O'Rand, 1982), y requiere la presencia de Ca^{2+} extracelular (Yanagimachi, 1970; Robertson y Mortimer, 1988; Anand et al., 1989). En espermatozoides de macho cabrío se ha observado un requerimiento de iones Ca^{2+} y de AMP-c para que la capacitación y la reacción acrosómica tengan lugar (Anand, 1989).

Actualmente se conocen tres mecanismos diferentes implicados en la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} durante la adquisición de la capacidad fecundante:

- 1.- Una Ca^{2+} -ATPasa, responsable del control del Ca^{2+} intracelular (Fraser y McDermott, 1992; Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1996);
- 2.- Un intercambiador Na^{+} - Ca^{2+} , introduciendo iones Na^{+} y expulsando Ca^{2+} , o Ca^{2+} dentro y Na^{+} fuera (Bradley y Forrester, 1982);
- 3.- Canales de Ca^{2+} , capaces de permitir influjos de Ca^{2+} (Fraser y McDermott, 1992).

En espermatozoides de ratón se ha observado la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular como consecuencia de la modulación de la Ca^{2+} -ATPasa por los FD, de este modo, si los FD han sido eliminados durante la capacitación, la actividad enzimática disminuye, produciéndose un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Fraser, 1992). La utilización de la calmodulina y/o inhibidores de la Ca^{2+} -ATPasa aceleran la capacitación en espermatozoides de varios mamíferos, sugiriendo la importancia de esta Ca^{2+} -ATPasa en la regulación de la capacitación (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1996).

2.4.2.2. IONES SODIO Y POTASIO

El ion Na^+ es uno de los iones más abundante no solo en los medios de cultivo "in vitro" sino también en los fluidos del tracto reproductivo. La presencia de iones Na^+ , durante la capacitación y la reacción acrosómica, es necesaria para que la fertilización tenga lugar (Fraser, 1994). Se requiere una baja concentración de Na^+ durante la capacitación, sin embargo las necesidades se disparan durante la reacción acrosómica.

Un posible regulador de la concentración intracelular de Na^+ es la bomba Na^+ , K^+ -ATPasa, una enzima que impulsa iones Na^+ al exterior y K^+ hacia el interior de la célula espermática. La actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa disminuye durante la capacitación, permitiendo el aumento de la concentración de Na^+ intracelular. La bomba Na^+ , K^+ -ATPasa parece estar más relacionada a nivel flagelar que al cefálico, induciendo cambios en el tipo de movimiento de los espermatozoides (Garcia-Soto et al., 1988; Quinn y White 1968). La concentración de iones Na^+ fluctúa en los fluidos del tracto reproductor de la hembra en los momentos próximos a la ovulación.

Durante la reacción acrosómica y fusión gamética es necesario el descenso de la concentración de K^+ (Fraser, 1983). El principal mecanismo implicado en la regulación de la concentración intracelular del K^+ es la Na^+ , K^+ -ATPasa, sin embargo el principal estimulador de la capacitación es el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ y no el descenso de la de la $[\text{K}^+]_i$. Así, si bien el K^+ extracelular no es responsable directo de la capacitación, elevadas concentraciones de K^+ permiten la capacitación espermática de manera secuencial pero no la fecundación hasta que dicha concentración desciende. Al igual que ocurre con el Na^+ , la concentración de K^+ en el fluido oviductal varía dependiendo del momento del ciclo de la hembra, siendo estos niveles bajos en el momento de la ovulación.

2.4.3. FACTORES DE DECAPACITACIÓN

El fenómeno de la capacitación espermática es un proceso reversible, tal como demuestran diversos autores (**Bedford et al., 1962; Chang , 1951**). Dicho proceso se debe a la habilidad de ciertas moléculas de disociarse y reasociarse con la membrana plasmática del espermatozoide. Estas moléculas, conocidas con el nombre de "factores de decapacitación" (FD), están presentes en plasma seminal, actuando como vesículas donadoras de colesterol y por tanto inhibiendo la capacitación (**Davis et al., 1980; Carbonero y Vázquez, 1984**). La mayor parte de los mecanismos de acción de los FD son desconocidos en la actualidad, existiendo evidencias de la modulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular en espermatozoides de ratón por dichos factores. La mayoría de los factores de decapacitación se encuentran en el plasma seminal, asociándose a los espermatozoides en el momento de la eyaculación (**Fraser, 1994; Cummins, 1994**), sin embargo, se han encontrado también FD de origen epididimario (**Fraser et al., 1990**). En gatos, los espermatozoides recuperados del epidídimo son capaces de fertilizar ovocitos inmediatamente después de su obtención, mientras que los espermatozoides eyaculados requieren un tiempo aproximado de capacitación "in vitro" de 3 horas.

Durante el paso de los espermatozoides a través del tracto genital de la hembra el plasma seminal se elimina, y con él, las moléculas responsables de la decapacitación espermática. Este proceso se puede realizar "in vitro" mediante la selección previa de los espermatozoides ("swim-up", gradientes de percoll, sephadex, dextrano, ...) e incubación en un medio de cultivo adecuado.

2.4.4. HIPERACTIVACIÓN

La capacitación de los espermatozoides de mamífero implica numerosos cambios

a nivel de la membrana plasmática, metabólicos, iónicos y cinéticos, estableciéndose una situación celular que se conoce con el nombre de hiperactivación espermática (HA). La hipercinesis es un fenómeno reversible. Siempre que hay capacitación se produce una hiperactividad, pero no siempre que hay hipercinesis tiene lugar la capacitación ni la reacción acrosómica.

La HA, detectada en 1970 por **Yanagimachi** en semen humano, es un proceso fisiológico asociado íntimamente con la ovulación y fertilización, siendo necesario la aparición de este tipo de movimiento para que los espermatozoides puedan atravesar la zona pelúcida (**Katz et al., 1989; Núñez et al., 1995; Burkman, 1995**).

La HA no es un evento sincronizado, presentándose subpoblaciones de espermatozoides hiperactivados a lo largo de la capacitación, apreciando su máximo momentos antes de hacerlo la reacción acrosómica (**Robertson et al., 1988; Aitken, 1990; Burkman, 1995**). Esta asincronía puede deberse a la gran variabilidad existente entre distintos eyaculados con respecto al pico de hiperactivación, o a la heterogeneidad en la duración de la misma (**Núñez et al., 1995**).

La utilización de analizadores computerizados de la movilidad espermática (Computer Assisted Sperm Analyzer, C.A.S.A.) ha permitido la valoración de diversos componentes de la movilidad imposibles de determinar "de visu". La utilización de estos equipos permite la obtención de una medida objetiva del movimiento del espermatozoide y de su trayectoria, la cual se ve modificada cuantitativa y cualitativamente a lo largo del proceso de hipercinesis. Mediante estos sistemas se ha caracterizado el movimiento espermático hiperactivado como un movimiento de gran curvatura y amplitud de su flagelo, observándose un aumento de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y velocidad curvilínea, así como una disminución del porcentaje de linealidad y velocidad lineal (**Burkman, 1995; Gómez et al., 1996**).

La movilidad espermática "in vitro" varía en función del medio donde se encuentren los espermatozoides, siendo muy susceptible a contaminaciones o cambios en las condiciones del medio (**Burkman, 1995; Vinader et al., 1997**). Concentraciones de K^+ extracelulares muy altas o bajas inducen un descenso en la HA y en la reacción acrosómica (**Fraser, 1983**). Las fluctuaciones intracelulares de calcio también inciden en la HA de las células espermáticas (**Robertson et al., 1988**), así niveles altos de calcio estimulan una hipercinésis y niveles bajos inhiben tal característica. La utilización de Ca^{2+} ionóforo ó dibutilil AMP cíclico aceleran la capacitación y la aparición de la HA (**Suarez y Osman, 1989**). La coincubación de espermatozoides con líquido folicular hace aumentar la población de células hiperactivadas, si bien esta acción se ve reforzada por la presencia de progesterona en el medio. La suplementación del medio de incubación con pentoxifilina, inhibidor de la fosfodiesterasa, estimula el movimiento espermático (**Núñez et al., 1994 a; Tournaye et al., 1994; Yovich, 1995**).

La información aportada por estudios cinéticos en relación a los niveles de espermatozoides hiperactivados existentes en la población, sirve como predicción de la funcionalidad y calidad de la muestra espermática. La HA está correlacionada positivamente con la morfología espermática, la capacidad de unión de los espermatozoides a la zona pelúcida (**Kruger et al., 1988**), y el test de hámster (**Jinno et al., 1987; Burkman, 1995**).

2.4.5. REACCIÓN ACROSÓMICA

La reacción acrosómica (RA) en espermatozoides de mamíferos es un proceso exocítico dependiente de calcio (**Robertson y Mortimer, 1988; Anand et al., 1989; Brucker y Lipford, 1995; Fraser et al., 1995**). El acrosoma espermático, vesícula secretora procedente del aparato de Golgi, está formado por una envoltura acrosómica en cuyo interior existen una gran variedad de enzimas hidrolíticas (**Olson y Winfrey,**

1991; Brucker y Lipford, 1995). Dichas enzimas, desempeñan un papel esencial durante la RA, siendo la liberación inicial de acrosina un estimulador de la RA (Meizel y Lui, 1976) y el responsable de la fijación del espermatozoide al ovocito (Aitken, 1990).

Debido a la posición que ocupa el acrosoma en la cabeza espermática, la membrana acrosómica se dobla, transcurriendo paralela por casi todo el territorio por el que se extiende (Fawcett, 1975). Durante la RA se produce la defenestración entre la membrana plasmática y acrosómica externa en la región apical y en el segmento principal del acrosoma por múltiples fusiones puntuales, debido principalmente a la acción de la fosfolipasa A₂ (Llanos et al., 1982; Watanabe y Masuda, 1989; Brucker y Lipford, 1995), mientras que el segmento ecuatorial permanece intacto durante todo el proceso (Olson y Winfrey, 1991; Fraser, 1994; Mendoza, 1996) (Fig.4).

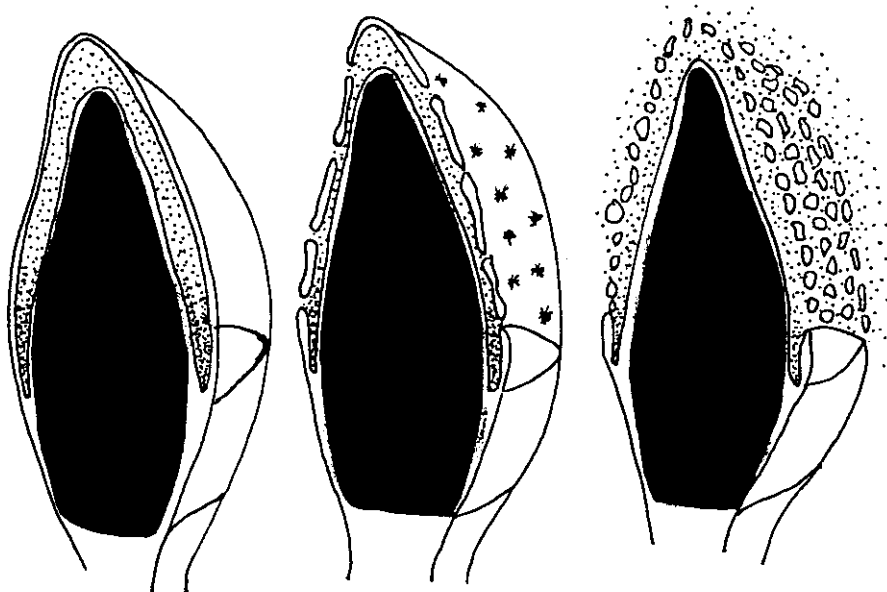


Fig.4.- Esquema del proceso de reacción acrosómica. Generación de múltiples sitios de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa dando lugar a la aparición de múltiples vesículas y vertido del contenido enzimático. El segmento ecuatorial permanece intacto en todo el proceso.

Las enzimas liberadas del acrosoma durante la RA facilitan el paso del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito, cúmulo ooforo y zona pelúcida (Chang, 1984; Fraser, 1994; Cummins, 1995). La sincronía entre ambos eventos es imprescindible para que la fecundación tenga lugar (Tesarik, 1989; Cummins, 1995). Así, una RA prematura implica un descenso de la fertilidad debido a la adhesión de los espermatozoides en la región que rodea las células del cúmulo ooforo. Los espermatozoides que sufren la RA después de atravesar el cúmulo ooforo son capaces de unirse a la membrana pelúcida, dando lugar a la penetración del ovocito (Crozet y Dummont, 1984; Crozet, 1988; Brucker y Lipford, 1995).

En la mayoría de los espermatozoides de mamífero es necesario que se produzca la RA, como consecuencia de la capacitación, para que la fusión con la membrana pelúcida tenga lugar (Crozet y Dummont, 1984; Myles et al., 1987; O'Rand, 1987; Crozet, 1988; Aitken, 1990; Fraser, 1994). Sin embargo, en espermatozoides de ratón se ha comprobado que sólo aquellas células espermáticas con acrosoma intacto pueden unirse a la membrana pelúcida (Florman y Storey, 1982). Algunas células espermáticas pueden sufrir la RA de manera espontánea, existiendo diversas experiencias que muestran la necesidad de moléculas específicas asociadas con el ovocito en la inducción de la RA.

Tras la interacción entre el receptor espermático y el estímulo procedente del ovocito, se dispara la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, donde el influjo de calcio, aumento del pH, receptores de proteína G, y activación de segundos mensajeros junto con la proteína kinasa C y la fosfolipasa, desempeñan un papel principal (Cummins, 1995; Brucker y Lipford, 1995). Como consecuencia de estos eventos se produce un incremento en la concentración de calcio intracelular, degradación de fosfoinosítoles y formación de diacilglicerol (DAG) que actuaría como mensajero intracelular de la fusión entre la membrana acrosomal externa y la plasmática, produciéndose la pérdida del acrosoma (O'Toole et al., 1996 a).

En la mayoría de las especies, la RA es inducida “in vivo”, en espermatozoides previamente capacitados, por determinadas sustancias presentes en los fluidos próximos al ovocito tales como: líquido folicular, cúmulo ooforo y células de la granulosa (Burcker y Lipford, 1995).

La proporción de espermatozoides susceptibles a esta amplia variedad de ligandos depende de la especie en estudio, del factor individual y de las condiciones del medio de cultivo. La presencia de iones K^+ en el medio es necesaria para que la RA tenga lugar, siendo las concentraciones muy altas o bajas responsables de una mala respuesta acrosómica. Se han encontrado concentraciones de K^+ entre 20 y 30 mM en fluidos procedentes del tracto de la hembra, proponiéndose una posible regulación “in vivo” de la RA en espermatozoides (Fraser, 1983).

La glucosa, utilizada frecuentemente como fuente de energía en los medios de cultivo, puede retardar la aparición de la reacción acrosómica (Rogers y Yanagimachi, 1975), mientras que otros azúcares como la fucosa, lactosa, L-glucosa y galactosa no ejercen esta acción sobre los espermatozoides.

La peroxidación lipídica y los radicales libres reducen la fluidez de la membrana plasmática, inhibiendo los procesos fusogénicos de membrana y por tanto la RA (Ohyashiki et al., 1988).

El desarrollo de las técnicas de fecundación “in vitro” (FIV) pretende analizar la capacidad fertilizante de un eyaculado (Takahashi et al., 1992), siendo la determinación de la RA en espermatozoides y el test de hámster las pruebas más correlacionadas con el FIV, si bien existen detractores de esta la primera técnica como método de predicción de la fertilidad (Vázquez et al., 1993).

2.4.5.1. INDUCTORES DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA

Existen diversos fluidos y moléculas capaces de inducir la reacción acrosómica “in vivo” y/o “in vitro” en espermatozoides de mamífero, requiriendo o no de una capacitación previa, tal es el caso de la progesterona (presente de manera fisiológica en las células del cúmulo y en el fluido folicular) (Emiliozzi et al., 1996), ionóforo A23187 y heparina (Aitken, 1990; Gutierrez et al., 1993; Cummins, 1995; Brucker y Lipford, 1995; Llanos y Anabalón, 1996; Cross, 1996). Los cambios de temperatura así como la congelación también inducen un aumento de la RA (Sánchez et al., 1991 a; Garde, 1992 b; Sánchez et al., 1995). La reacción acrosómica inducida (fisiológica) y no la espontánea tiene función biológica esencial (Tesarik, 1989), de ahí la importancia de conocer la curva de capacitación (Garde, 1992 b; Takahashi et al., 1992) y la distinción entre RA inducida y espontánea (Cummins, 1995).

Los inductores de la RA son utilizados generalmente en programas de fecundación “in vitro” con el fin de aumentar el porcentaje de espermatozoides potencialmente capaces de fecundar un ovocito. Así mismo, dichas sustancias son utilizadas en pruebas diagnósticas de la capacidad fecundante de un eyaculado.

2.4.5.1.1. Ionóforos

Los ionóforos son moléculas capaces de estimular la RA en espermatozoides capacitados mediante la inducción de un flujo de calcio hacia el interior del espermatozoide (Cummins, 1994; Carrell et al., 1996). Si bien estos inductores son utilizados ampliamente en pruebas laboratoriales, los resultados han de ser correctamente analizados, ya que: 1) son moléculas potencialmente citotóxicas; y 2) ejercen una acción negativa sobre la movilidad y viabilidad espermática.

Existen diversos ionóforos comercializados, siendo el ionóforo A23187 el más utilizado en la inducción de la RA (Aitken et al., 1984; Roldan y Harrison, 1989; Tesarik, 1993; Bielfeld et al., 1994; Carrell et al., 1996). El efecto ejercido por los ionóforos sobre los espermatozoides varía dependiendo de la concentración espermática y del nivel de proteínas presentes en el medio (Roldan y Harrison, 1989; Cummins, 1994). La concentración de ionóforo A23187 y el tiempo de exposición al que se somete a los espermatozoides varía dependiendo de la especie y del medio utilizado, por lo que no existe uniformidad en el método utilizado por los diversos autores (Tabla 5).

Tabla 5.- Concentración de Ca^{2+} ionóforo A 23187 y tiempo de exposición para las diferentes especies.

Especie	[Ca^{2+} ionóforo]	Tiempo	Referencia
Bovino	10 μM	60 min.	Fraser et al., 1995.
	1 μM	60 min.	Whitfield et al., 1995.
Equino	5 μM	30-60 min.	Valcárcel et al., 1996.
Porcino	2 μM	30 min.	Berger et al., 1988.
Hamster	20 μM	10 min.	Tateno et al., 1996.
Humano	10 μM	30 min.	Bielfeld et al., 1994.
	50-100 μM	0.5-3.0 h.	Aitken et al., 1984.
Ovino	10 μM	-	Roldan et al., 1989*.
	1 μM	-	Roldan et al., 1989**
	5 μM	30-60 min.	Pérez et al., 1996
Caprino	10 μM	-	Bawa et al., 1993.
	0.5 μM	2 min.	Hanada, 1985.

* Medio con BSA; ** Medio sin BSA

El momento de aplicación del calcio ionóforo influye sobre el total de espermatozoides reaccionados, no mostrando diferencias significativas en el valor absoluto de la prueba (Cummins et al., 1991). La incubación durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad del semen puro de morueco, induce no sólo el aumento del porcentaje de espermatozoides reaccionados, sino que también el incremento de la proporción de células espermáticas susceptibles al ionóforo (Pérez et al., 1997).

2.4.5.1.2. Zona Pelúcida

La mayoría de la información de la que se dispone actualmente sobre la inducción de la RA se debe a la utilización de ovocitos de hembra de ratón (Cummins, 1994). Partiendo de estudios realizados en esta especie, se ha llegado a determinar la composición de la membrana pelúcida. Dicha membrana esta compuesta por tres glicoproteínas (en algunas especies 4): ZP1, ZP2 y ZP3. Estas dos últimas, Zp2 y ZP3, son moléculas de aspecto filamentoso unidas por ZP1, más globular, dando lugar a la formación de una red tridimensional. ZP1 y ZP2 son glicoproteínas estructurales, mientras que la glicoproteína ZP3 es la encargada del reconocimiento e inducción de la reacción acrosómica en ratón. El reconocimiento entre ambos gametos parece estar mediado por un carbohidrato de la glicoproteína ZP3, presente en la zona pelúcida del ovocito, y por una enzima galactosil-transferasa localizada en la membrana plasmática del espermatozoide (Burckman y Lipford, 1995).

Debido a la especificidad de la membrana pelúcida, dichas membranas son obtenidas a partir de ovocitos de la misma especie que los espermatozoides estudiados.

2.4.5.1.3. Líquido folicular, oviductal y células del cúmulo

El fluido folicular ha sido ampliamente utilizado como estímulo de la movilidad espermática e inductor de la RA (Cummins, 1994; Burcker y Lipford, 1995). El estudio de la composición del fluido folicular ha mostrado la presencia de proteasas, inhibidores de proteasas, péptido natriurético auricular (PNA), antitrombina III, además de una amplia variedad de esteroides.

El fluido oviductal desempeña un papel decisivo al final de la capacitación “in vivo”, induciendo la RA. Sin embargo, la dificultad de obtener la suficiente cantidad de éste líquido para el desarrollo de los diversos estudios, hace que este fluido no sea comúnmente utilizado. Existen observaciones que muestran el fluido oviductal es mejor que el folicular para el mantenimiento de la movilidad “in vitro” (Zhu et al., 1994). El cocultivo de los espermatozoides con células procedentes del oviducto presenta unos buenos resultados de capacitación y RA (Gutierrez et al., 1993; Park y Sirard, 1996).

Estudios realizados tanto “in vivo” como “in vitro” muestran la acción del cumulo ooforo como ponteciadador de la RA, siendo su acción similar a la encontrada en el líquido folicular (Cummins, 1994). Martín-Lunas et al. en 1996 observan que la inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides de macho cabrío es independiente de la calidad de del cúmulos ooforo.

2.4.5.1.4. Progesterona

La progesterona induce el influjo de calcio hacia el interior del espermatozoide, lo que resulta en un incremento de la RA (Emiliozzi et al., 1996; O'Toole et al., 1996 b). Parece existir un receptor no genómico en la superficie del espermatozoide.

La progesterona estimula la exocitosis en espermatozoides previamente capacitados de manera dosis-dependiente (Llanos y Anabalón, 1996; Emiliozzi et al., 1996), siendo utilizado en casos de infertilidad masculina como potenciador de la capacidad fecundante (Emiliozzi et al., 1996). El flujo de iones Na^+ (O'Toole et al., 1996 b) y la acción de una tripsin-proteasa (Llanos y Anabalón, 1996) parecen estar implicados en el mecanismo de acción de la progesterona.

2.4.5.1.5. Moduladores metabólicos

Tanto la capacitación, hiperactivación como la reacción acrosómica son procesos dependientes de AMP cíclico (AMP-c) (Anand et al., 1989; Cummins, 1994; Fraser et al., 1995). La utilización de xantina, cafeína, teofilina y pentoxifilina produce un aumento de la concentración de AMP-c debido a la inhibición de la fosfodiesterasa (Cummins, 1994), existiendo una posible acción sobre la fluidez de la membrana espermática mediante su interacción con receptores adenosínicos. La cafeína muestra efectos negativos sobre la viabilidad espermática debido a su acción como inhibidor de los mecanismos de reparación del DNA y a su potencial mutagénico (Fernández et al., 1990). La pentoxifilina incrementa el porcentaje de RA y la movilidad espermática, siendo su uso recomendado en eyaculados de baja movilidad (Nuñez et al., 1994 a).

Los análogos del AMP-c (ej. dibutiril AMP-c) estimulan la actividad de la proteína-Kinasa, incrementando el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

2.4.5.1.6. Efecto de la disminución térmica

Estudios recientes muestran un aumento del porcentaje de RA, correlacionado positivamente con el FIV (Cummins, 1994) y test de hamster (Sánchez y Schill, 1991

a), como consecuencia del descenso de temperatura. Actualmente no existe una explicación clara de este fenómeno, pero probablemente las bajas temperaturas inactivan la bomba de calcio, encargada de mantener los niveles de calcio intracelular bajos, permitiendo un influjo de calcio e incrementando la RA.

Si bien el objetivo principal de la congelación espermática es el almacenamiento de dosis por un período indefinido de tiempo, se ha observado un aumento de la RA en dosis descongeladas de ovino (Garde et al., 1992 b) y humano (Centola et al., 1990).

2.4.5.1.7. Otros factores

Los glicosaminoglicanos (ej. heparina) forman parte importante de la composición de los fluidos del tracto reproductor de la hembra, tales como en el moco cervical, fluidos folicular y oviductal además de formar parte del gel que soporta el cumulo ooforo (Cummins, 1994). Estos compuestos son utilizados como compuestos inductores de la capacitación espermática, incrementando el porcentaje de células hiperactivadas así como la RA (Ávila Cantariño et al., 1993; Fraser et al., 1995; Cox et al., 1995). La acción de la heparina es contrarrestada por la glucosa, antagonizando su acción sobre la adenilato ciclasa.

Las secreciones de la glándula bulbouretral de macho cabrío añadidas a un medio de leche también son capaces de inducir la RA, mientras que las secreciones procedentes de las vesículas seminales contrarrestan este efecto (Courstens et al., 1984).

Las catecolaminas incrementan la movilidad espermática así como el porcentaje de espermatozoides de hámster reaccionados en presencia de BSA (Cornett y Meizel, 1978).

2.4.5.2. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA

El análisis de los cambios ocurridos en el espermatozoide durante la reacción acrosómica bajo condiciones “in vivo” o “in vitro”, requiere la utilización de diversos métodos de detección del estado acrosoma (Cummins, 1994). La determinación de este proceso exocitótico es complicado, ya que las características del acrosoma espermático varían en función de la especie en estudio, debiendo de adaptar cada técnica de análisis según la especie. Además, los espermatozoides muertos pueden sufrir cambios degenerativos en su acrosoma similares a los observados durante la reacción acrosómica, de ahí la importancia de determinar la presencia o ausencia del acrosoma en espermatozoides viables y/o no viables (muertos).

La mayoría de los estudios realizados sobre el estado del acrosoma en espermatozoides se basan en la utilización de técnicas de microscopía electrónica y de fluorescencia, determinando la presencia, forma y/o tamaño del acrosoma. La microscopía óptica y de contraste de fases, si bien revelan información útil sobre éste liposoma modificado, se muestran como técnicas poco precisas en un estudio detallado del estatus acrosomal. Sin embargo, la microscopía electrónica y de fluorescencia requiere equipos costosos y un entrenamiento del personal técnico (Cummins, 1994), por lo que su uso generalmente, se restringe a determinados estudios y no como metodología de rutina.

La utilización de la microscopía de fluorescencia suele ir asociada a la utilización de lectinas vegetales (Tesarik et al., 1993; Cummins, 1994) o anticuerpos (Fénichel et al., 1989; Sánchez et al., 1991 b; Cummins, 1994; Moutaffian y Parinaud, 1995), unidos normalmente a marcadores fluorescentes (ej. fluoresceína, isotiocianato fluorescente). Tanto las lectinas como los anticuerpos se pueden dirigir contra el contenido acrosómico o contra la membrana del acrosoma. Las lectinas determinan la presencia y distribución de determinados azúcares en la membrana plasmática y/o en la

membrana acrosomal interna (si se ha producido previamente la RA). Algunas lectinas utilizadas en la detección de los procesos de capacitación, tales como: *Pisum Sativum* (PSA), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Maclura pomifera* (MPA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Glycine max* (SBA) y *Triticum vulgare* (WGA) (Centola et al., 1990; Cummins et al., 1991; Bawa et al., 1992; Tesarik et al., 1993; Cummins, 1994; Jimenez Cabras, 1995; Liu y Gordon, 1995; Valcárcel et al., 1996). En espermatozoides de macho cabrío se ha detectado la presencia de MPA, BSA y WGA en la región cefálica tras la capacitación espermática, existiendo un aumento de los receptores de ConA tras la RA (Bawa et al., 1992). Berger en 1990, propone la utilización de la lectina PSA como método de detección del acrosoma en espermatozoides procedentes de eyaculados de macho cabrío. El uso de lectinas suele ir asociado a test vitales o a test de permeabilidad de membrana con el fin de diferenciar el estado del acrosoma en células viables y no viables (Sánchez et al., 1991 b; Cummins, 1994; Gómez et al., 1996 a; Valcárcel et al., 1996). La técnica de la clorotetraciclina (CTC) y la utilización de BSA unido a quinacrina o fluoresceína, son métodos de fluorescencia alternativos en la detección del acrosoma espermático (Abdel-Halim et al., 1996; Pérez et al. 1996).

La utilización de anticuerpos monoclonales o policlonales determina la presencia o no del acrosoma mediante la unión de dichos anticuerpos a receptores específicos presentes en la superficie de la membrana (Fénichel et al., 1989; Sanchez et al., 1991 a; Cummins, 1994; Moutaffian y Parinaud, 1995). La mayor ventaja que presenta esta técnica sobre la utilización de lectinas se debe a la posibilidad de identificar el estado del acrosoma en presencia de glicoconjugados y de otro material celular.

Debido a la complejidad de las diversas técnicas anteriormente citadas, y a la imposibilidad de observación del acrosoma mediante contraste de fases en determinadas especies, como es el caso del humano, la evaluación de la presencia o ausencia del acrosoma mediante tinciones para microscopía óptica de campo claro, es actualmente,

una de las técnicas de mayor difusión entre los diversos equipos investigadores. Entre las tinciones más utilizadas es de resaltar la triple tinción, descrita por primera vez por **Talbot y Chacon** en 1981 para semen humano. Esta técnica es capaz de clasificar los espermatozoides en cuatro categorías (vivos con acrosoma intacto; vivos reaccionados; muertos con acrosoma intacto y muertos reaccionados) mediante el empleo de azul Tripán, marrón Bismark y rosa de Bengala. La triple tinción ha sufrido distintas modificaciones en su adaptación a diversas especies: equidos (**Varner et al., 1987**), caprinos (**Kusunoki, 1984; Martín-Lunas et al., 1996**), porcinos (**Vázquez, 1991**), bovidos (**Didion y Graves, 1986**) y ovidos (**Garde et al., 1992 a**). Debido al tiempo que consume esta técnica para su realización, se ha descrito una variante de esta tinción, en la que el azul Tripán ha sido omitido.

2.4.6. CAPACITACIÓN “IN VITRO”

Debido a la gran dificultad que presenta el estudio de la capacitación espermática de manera fisiológica en el tracto reproductor de la hembra, es decir “in vivo”, se ha conseguido inducir este proceso en el laboratorio mediante técnicas, medios de cultivo y condiciones ambientales determinadas, en lo que se denomina capacitación “in vitro”. Las técnicas englobadas bajo el término “in vitro” no sólo sirven de vehículo a la observación de la biología de la capacitación, sino que además, son utilizadas en reproducción asistida como métodos de potenciación de la capacidad fecundante de un eyaculado (**Maneiro, 1991; Yovich, 1995**).

El desarrollo de técnicas capaces de recuperar los espermatozoides móviles del total de la población, nos permite seleccionar aquellas células espermáticas con mayor movilidad y capacidad fecundante, siendo posteriormente aplicables en programas de inseminación intrauterina (IU) y FIV (**Yovich, 1995**). Dichas técnicas inducen la

capacitación espermática debido a la eliminación del plasma seminal, y por lo tanto de los FD (a la vez que impurezas presentes en el eyaculado), activando los procesos de HA y RA. Entre las técnicas de recuperación de espermatozoides móviles más utilizadas encontramos el “swim-up”, gradientes de percoll, filtración en columnas de Sephadex y el dextrano, existiendo como metodologías simples o combinaciones entre ellas (Alvarez et al., 1993; Seidel et al., 1995; Parrish et al., 1995, Nuñez et al., 1996; Garcia-Lopez et al., 1996; Al-Hasani et al., 1996; Pérez et al., 1996; Anzar y Graham, 1996).

Estudios comparativos entre las distintas metodologías de capacitación “in vitro” muestran la técnica de “swim-up” como el método más sencillo y barato, obteniendo resultados similares, en cuanto al número de espermatozoides móviles y concentración espermática recuperados a los encontrados en gradientes de percoll (Mortimer et al., 1984; Morales et al., 1991; Nuñez et al., 1996). Sin embargo, cuando los eyaculados en condiciones iniciales presentan baja calidad seminal, se observa un incremento en la concentración espermática recuperada y del porcentaje de espermatozoides móviles tras la utilización de gradientes de percoll con respecto a los resultados obtenidos mediante swim-up (Morales et al., 1991; Parrish et al., 1995). La centrifugación requerida en las técnicas de swim-up y percoll induce la formación de radicales libres, cuyo efecto negativo puede ser prevenido por la adición de antioxidantes al medio de lavado (Griveau y Lannou, 1994).

Los medios de incubación utilizados en la inducción de la capacitación “in vitro” poseen una alta fuerza iónica con el objeto de desplazar los FD, y un pH alcalino (pH: 7,8-8), responsable de apartar las proteínas de la superficie de la membrana plasmática, incrementando el flujo de calcio hacia el interior de las células espermáticas y produciendo una activación de las fosfolipasas (Iwamatsu y Chang, 1971).

La incubación de los espermatozoides con el fin de inducir “in vitro” la

capacitación espermática requiere condiciones ambientales definidas de humedad y CO₂ (5%), observándose variaciones en la temperatura (+37°C ó +39°C) y tiempo de incubación (3, 6,..., 24 horas) según la especie y procedencia de los espermatozoides (Anand et al., 1989). Los procesos de capacitación y RA "in vitro" se presentan más rápidamente cuando las células espermáticas se preincuban a +39°C (Garde, 1992 b), siendo este efecto más evidente cuando los espermatozoides proceden de dosis congeladas (Garde, 1992 b; Park y Sirard, 1996; Pérez et al., 1996).

Actualmente la utilización de inductores de la reacción acrosómica junto con técnicas de capacitación "in vitro" nos permite obtener mayor información acerca de posibles disfunciones de la capacidad fecundante de los espermatozoides. El test ARIC (Acrosomal Reaction Induction Challenger) es utilizado actualmente con éxito como prueba diagnóstica de la capacidad fecundante de un eyaculado en semen humano (Cummins et al., 1991). La estimulación del máximo de reacción acrosómica mediante la utilización de ionóforo A23187 varía en función de la especie, concentración espermática y características del medio utilizado. La diferencia existente entre la muestra inducida con el ionóforo y la control (muestra espermática sometida a un medio con 10% de DMSO), proporciona información acerca del porcentaje de células espermáticas potencialmente fértiles (valor del ARIC) (Cummins et al., 1991). Los resultados obtenidos mediante el test ARIC están correlacionados positivamente en semen humano con la penetración en ovocitos homólogos y heterólogos (ovocitos de hámster). Un incremento inferior al 5% de reacción acrosómica tras la adición del ionóforo esta correlacionado con eyaculados de bajas tasas de fecundación. El test ARIC resulta más económico a la vez que requiere de un tiempo menor para su realización (Cummins, 1995).

La pentoxifilina, inductor de la HA y RA, es utilizada en muestras espermáticas previamente capacitadas como prueba diagnóstica de infertilidad (Cummins, 1994).

2.5. FECUNDACIÓN

Los espermatozoides depositados en el tracto reproductor de la hembra tras la eyaculación, son transportados hasta al lugar de encuentro con el ovocito mediante movimientos y contracciones musculares del útero (inducidas por la cópula), a la vez que se ayudan del movimiento activo generado por el flagelo espermático (**Lorenzo, 1994**). Durante el transporte, se produce la selección de los espermatozoides a su paso por las distintas estructuras del tracto reproductor femenino, iniciándose la capacitación espermática gracias a la eliminación del plasma seminal y a la interacción con los fluidos uterinos y oviductales (**Cummins y Yanagimachi, 1982**).

Una vez que la capacitación ha tenido lugar, dando paso a la HA y RA, se produce la fusión gamética. Después que el espermatozoide ha sido incorporado al citoplasma ovocitario, desaparece la membrana nuclear del espermatozoide y ocurre la descondensación de la cromatina espermática. La fusión del espermatozoide con el ovocito ocasiona ciertos cambios a nivel de la membrana plasmática ovocitaria, provocando la ruptura de los gránulos corticales, cuyo contenido al contacto con la zona pelúcida provoca la llamada “reacción de zona” (**Vigil y Leontic, 1986; Lorenzo, 1994**). Estos mecanismos evitan la posibilidad de poliespermia. Existen especies que dependen únicamente de la reacción a nivel de la zona pelúcida para evitar la poliespermia (ej: ovocitos de hamster), por lo que si se denuda su zona pelúcida se puede producir la penetración de varios espermatozoides (**Vigil y Leontic, 1986**).

Los mecanismos anti-polespermia funcionan a dos niveles, en la membrana vitelina del ovocito y en la zona pelúcida, interviniendo activamente las ZP. Algunas enzimas de los gránulos corticales inactivan o enmascaran las funciones de las glicoproteínas ZP2 y ZP3, imposibilitando la fijación de otros espermatozoides a la misma (**Wassarman, 1990; Yanagimachi, 1984**). La eficacia de estos mecanismos varía entre las distintas especies animales, siendo muy efectivo el bloqueo en la perra, vaca y hamster, mientras que en ratona

y coneja no lo es tanto (Lorenzo, 1994). En salamandras y pájaros, numerosos espermatozoides son capaces de fusionarse con el ovocito dando lugar a la formación de varios pronúcleos (PN) masculinos, sin embargo, sólo uno de ellos es capaz de unirse al pronúcleo femenino, produciéndose la degeneración del resto de los PN.

Tras la fecundación, los componentes celulares del espermatozoide se incorporan al citoplasma del ovocito. La cabeza espermática descondensada y los cromosomas femeninos se rodean de una membrana nuclear, procedente del retículo endoplásmico del ovocito, constituyéndose los PN masculino y femenino. El núcleo femenino, detenido en el momento de la ovulación en el estadio de metafase de la segunda división meiótica, finaliza la segunda de las divisiones meióticas y extruye el segundo corpúsculo polar al espacio perivitelino, comenzando la descondensación y replicación del ADN como paso previo a la sincariosis y a la primera división de segmentación embrionaria (Vigil y Leontic, 1986; Lorenzo, 1994).

2.5.1. FECUNDACIÓN “IN VITRO”

Los estudios realizados sobre la fecundación “in vitro” (FIV) fueron desarrollados, originalmente, con el objeto de dilucidar los mecanismos y procesos que intervenían en la fecundación (Cummins y Yanagimachi, 1982). Sin embargo, actualmente son aplicados como test de capacidad fecundante de machos, así como a la obtención de embriones a partir de ovarios conseguidos en el matadero, sobre todo en rumiantes y cerdos, dando también soluciones a ciertos tipos de infertilidad.

Las técnicas de fecundación “in vitro” consisten, básicamente, en la exposición de ovocitos maduros a espermatozoides capacitados, de tal manera que se produzca la fecundación fuera del oviducto materno. Recientemente se ha dado mucha importancia a la microinyección de un espermatozoide en un ovocito debido a la posibilidad de conseguir su fecundación a partir de células espermáticas inmóviles e incluso muertas (Goto et al., 1990;

Goto et al., 1995; Dell'aquila et al., 1997; Gómez y Pellicer, 1997), observándose una disminución en el tiempo de formación de los pronúcleos cuando se microinyecta un espermatozoide reaccionado frente a uno con acrosoma intacto (**Ryul et al., 1997**).

Los ovocitos utilizados en las técnicas de FIV pueden ser de la misma especie que los espermatozoides, *FIV homólogos*; o de distinta, *FIV heterólogos*, necesitando en este caso la denudación de la zona pelúcida. Los sistemas FIV homólogos son empleados para la obtención de embriones cuando la fecundación "in vivo" no puede llevarse a término (problemas de infertilidad, ovocitos obtenidos de matadero, ...) así como para el estudio de los mecanismos fisiológicos implicados en la fecundación (**Ball et al., 1983; Nagai et al., 1984; Cox et al., 1995; Martino et al., 1995**). La fecundación heteróloga, en la que se utilizan mayoritariamente ovocitos denudados de hamster dorado, es aplicada principalmente como test de la capacidad fecundante de machos, siendo también utilizados, al igual que el sistema anterior, para el estudio de la fusión gamética (**Kato et al., 1985; Graham y Foote, 1987; Kusunoki et al., 1989; Tateno et al., 1996; Garde, 1992 b; Berger et al., 1994; Seidel et al., 1995; Palomo et al., 1995**). El test de *Fucus* utiliza ovocitos procedentes de algas para la selección de espermatozoides potencialmente fértiles, evidenciando la capacidad fecundante de un eyaculado (**Jimenez Cabras, 1995**).

Los ovocitos empleados para ambos sistemas pueden haber sido madurados "in vivo" (**De Smedt et al., 1992; Crozet et al., 1995**) ó "in vitro" (**Ball et al., 1983; Song e Iritani, 1988; Martino et al., 1995; Cox et al., 1995; Park y Sirard, 1996**), disminuyendo la eficacia de los procesos FIV respecto a la fecundación natural, de igual modo que cuando se utilizan ovocitos madurados "in vivo" frente a los madurados "in vitro" (**De Smedt et al., 1992; Lorenzo, 1994; Crozet et al., 1995**). Los ovocitos inmaduros obtenidos a partir de ovarios de cabras son especialmente sensibles a la temperatura (**De Smedt et al., 1992**).

Después de obtener ovocitos maduros y espermatozoides capacitados, deben fijarse las condiciones ambientales a las que se someten los gametos para que la fecundación tenga

lugar. El tiempo y temperatura de cocultivo de ambos gametos así como la concentración espermática utilizada varía en función de la metodología empleada por los distintos autores (Tabla 6). El número de espermatozoides utilizados por ovocito es un factor limitante del éxito de la FIV (Berger, 1989; Foxcroft et al., 1995; Palomo et al., 1995), ya que si se utiliza una baja concentración puede no producirse la fecundación, mientras que si es demasiado alta se pueden producir fenómenos de poliespermia (Foxcroft et al., 1995). La utilización de 100 µg/ml de heparina sobre una concentración espermática final de 5 millones de espermatozoides/ml se muestra como el tratamiento más adecuado para la capacitación de semen caprino debido a su menor índice de poliespermia (Palomo et al., 1995).

Tabla 6.- Condiciones de cocultivo utilizadas en la realización FIV.

Especie	Coincubación (Horas)	Concent. Espz. (millones/ml)	FIV	Referencia
Porcino	3-5	4	Heteróloga	Berger y Parker., 1989.
	28-29	2	Homóloga	Nagai et al., 1984.
Bovino	6	1-2	Heteróloga	Bousquet et al., 1982.
	24-48	4	Homóloga	Ball et al., 1983.
Humano	3	2	Heteróloga	Renard et al., 1996.
	3	2.5-20	Heteróloga	Wolf et al., 1983.
	16	-	Homóloga	Wolf et al., 1983.
Ovino	4-5	1	Heteróloga	Garde, 1992 b.
	16	1	Homóloga	Crozet et a., 1987.
Caprino	25	400-500	Homóloga	Song et al., 1988*.
	5	10	Heteróloga	Berger, 1989.
	18	1	Homóloga	Cox et al., 1995.
	17	1	Homóloga	Martino et al., 1995.

* Espermatozoides procedentes del epidídimo.

El mantenimiento de las propiedades fisicoquímicas durante todo el proceso es determinante para conseguir buenos resultados. El pH del medio de cultivo varía entre 7,4 y 7,8, mientras que la osmolaridad oscila entre 290-300 mOsm/kg (Aitken et al., 1983; Yanagimachi, 1984; Berger y Parker, 1989). La concentración gaseosa es la misma que las utilizadas en los sistemas de maduración "in vitro" 2,5% de CO₂ y 95% de humedad en el aire. La concentración de albúmina utilizada en los medios de cultivo varía entre 0,3 y 3,5% (Yanagimachi, 1984). La presencia de calcio y metabolitos exógenos como fuente de energía son requeridos en el caso de preincubaciones prolongadas. La adición de metilxantinas incrementa la penetración espermática en ovocitos de bovino madurados "in vitro" (Hamawaki et al., 1995).

Los medios utilizados en FIV son básicamente los mismos que los utilizados en la maduración "in vitro" de los ovocitos o en la preparación y capacitación de los espermatozoides (BWW, M-199, KRB-m, TALP). La utilización de antioxidantes al medio de cultivo no resulta en un aumento del número de ovocitos útiles madurados "in vitro" (Elhassan y Wright, 1995).

2.5.1.1. TEST DE HAMSTER.

En 1976 Yanagimachi y colaboradores descubrieron la capacidad del ovocito de hamster dorado, tras eliminación de su zona pelúcida, de fusionarse con espermatozoides humanos después de ser capacitados "in vitro" y haber sufrido la reacción acrosómica. A partir de este momento, se realizaron numerosos estudios para determinar la capacidad fecundante de los espermatozoides "in vitro" mediante la aplicación del test de hamster en una gran variedad de mamíferos como método alternativo al test de penetración homólogo. Entre estas especies se puede incluir el toro (Bousquet y Brackett, 1982; Graham y Foote, 1987; Kreysing et al., 1995), caballo (Brackett et al., 1982), verraco (Berger y Parker, 1989; Seidel et al., 1995), ciervo (Garde et al., 1994), morueco (Garde, 1992 b;

Choudhry et al., 1995) y macho cabrío (Kato et al., 1985; Kusunoki et al., 1989; Berger, 1989; Berger et al., 1994; Palomo et al., 1995). Los resultados obtenidos mediante la fecundación "in vitro" heteróloga sirven de ayuda en el diagnóstico y selección de los individuos reproductores (Virgil y Leontic, 1986; Graham y Foote, 1987) siempre y cuando se hayan caracterizado previamente las condiciones óptimas de esta técnica para la especie en cuestión (Graham y Foote, 1987; Berger y Parker, 1989), existiendo, sin embargo, variaciones en la metodología entre los distintos autores (Tabla 6).

Tabla 6.- Variación de las condiciones de cocultivo heteróloga (test de hamster)

Especie	Preincub (horas)	Cocultivo (horas)	Conc. Espz (millones/ml)	nº ovocitos	Referencia
Porcino	1-5	3-5	4	20	Berger et al., 1989
	1	18	2	30	Seidel et al., 1995
Bovino	1	6	1-2	5-10	Bousquet et al., 1982.
	-	3	6	-	Graham y Foot, 1987.
Humano	3	2	2	20	Sanchez y Schill, 1991.
	3	3	2	40	Renard et al., 1996.
Ovino	6	4-5	10	20	Garde, 1992 b.
	1-3	5	6-9	20	Chandhry et al., 1995.
Caprino	5,5	5	10	50	Kato et al., 1984.
	1	5	10-40	-	Berger et al., 1990.
	-	17	5	15	Palomo et al., 1995.

Se ha demostrado que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de espermatozoides utilizada y el resultado del test de hamster (Martin y Taylor, 1983, Berger, 1989). Los resultados encontrados en el test de hamster tras la

utilización de concentraciones espermáticas de 40 millones de espz/ml en semen caprino, no difieren significativamente de los obtenidos con 10 millones espz/ml (**Berger, 1989**). La concentración óptima establecida por diversos autores oscila entre 1 a 10 millones de espz/ml (**Martin y Taylor, 1983; Vigil y Leontic, 1986; Choudhry et al., 1995**).

Otra gran ventaja que presenta esta técnica es la posibilidad de congelar y almacenar, por un tiempo indefinido de tiempo, los ovocitos obtenidos a partir de hembras de hamster doradas superovuladas, evitando el mantenimiento de una colonia de animales reproductores y de sus instalaciones (**Tobback et al., 1991**). Las tasas de recuperación de ovocitos obtenidos con membrana pelúcida íntegra y citoplasma esférico tras su descongelación se sitúa sobre el 94% (**Tobback et al., 1991**).

Se han realizado múltiples intentos de correlacionar las distintas pruebas de laboratorio con el test de hamster, no encontrándose una relación bien definida entre el resultado del test y parámetros como la movilidad o concentración espermática (**Rogers, 1985**). **Garde en 1992 b** demostró la existencia de una correlación positiva entre el test de hamster, endósmosis y triple tinción en semen capacitado de morueco. Diversas investigaciones realizadas en especies domésticas muestran altas correlaciones entre el test de hamster y la fertilidad "in vivo" en ganado vacuno y porcino (**Graham y Foote, 1987; Berger y Parker, 1989**), existiendo variación en la penetración de ovocitos entre los distintos sementales (**Bousquet y Brackett, 1982; Garde, 1992 b**). **Berger en 1989**, observa una relación positiva pero no significativa entre el TH y la morfometría espermática en semen caprino.

Los resultados positivos obtenidos en el test de hamster indican exclusivamente la capacidad de los espermatozoides en sufrir la capacitación, RA y fusión con la membrana del ovocito, por lo que no necesariamente, estos resultados positivos implican que los espermatozoides en cuestión puedan fecundar "in vivo", ya que la fecundación implica otros muchos factores. Ello hace, que esta prueba no sea tan sensible como la FTV homóloga. Los

muchos factores. Ello hace, que esta prueba no sea tan sensible como la FIV homóloga. Los resultados negativos indican claramente que los espermatozoides son incapaces de realizar alguno o todos de los procesos anteriormente citados, y que además, probablemente sean incapaces de fecundar "in vivo".

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1.1. MACHOS REPRODUCTORES

Han sido seleccionados para este estudio 5 machos cabríos, 3 de la raza Malagueña y 2 de raza Murciano-Granadina, de un lote de partida de 10 individuos, todos ellos pertenecientes al Área de Reproducción Animal del CIT/INIA de Madrid. La edad media del rebaño al inicio de la experiencia fue de 11 meses, siendo necesario el entrenamiento previo de los mismos durante 3 meses.

Los machos fueron mantenidos en régimen de semi-estabulación, con alimentación homogénea durante todo el año: pienso concentrado (750 g/animal/día), paja de cereales y heno de alfalfa (750 g/animal/día), bloques de minerales-oligoelementos y agua a libre disposición a lo largo de toda la experiencia.

Los animales fueron desparasitados dos veces al año mediante la aplicación intramuscular de 2 cc de Ivomec. Coincidiendo con el comienzo del invierno se les suministró un complejo vitamínico, 2 cc Vit. A+D.

3.1.1.2. HUEVOS DE GALLINA

Se utilizó como crioprotector no penetrante yema de huevo de gallina, con no más de 3-4 días desde la puesta hasta el momento de su utilización, siendo este tiempo variable dependiendo de la estación del año (en época estival se ha de realizar un control más estricto).

La calidad de la yema de huevo varía en función de la raza y de la alimentación de las gallinas.

3.1.1.3 OVOCITOS DE HAMSTER

Se emplearon ovocitos congelados de hamster dorado (*Mesocricetus auratus*) para la realización de la prueba de penetración espermática, suministrados por el Departamento de Biología Celular y Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Barcelona (**Grossmann et al., 1991**). Dichos ovocitos se obtuvieron de hembras hamster superovuladas con PMSG y HCG. Quince horas después de la inyección de HCG fueron sacrificadas por dislocación cervical, extrayendo los oviductos para obtener masas de cúmulo ooforo. Las células del cúmulo fueron dispersadas con hialuronidasa al 0.1%. Los ovocitos fueron congelados libres de células foliculares.

Los ovocitos se presentan en pajuelas termoselladas de 0,25 ml, con un contenido medio de 12-13 ovocitos/pajuela. El almacenamiento de las pajuelas se realiza en tanques criogénicos a una temperatura de -196° C.

3.1.2. MATERIAL EMPLEADO EN LA RECOGIDA DEL SEMEN

- Caja de transporte.
- Colectores de cristal graduados en 0,1 ml (10 ml), I.M.V. Mod. VA 134
- Estufa de incubación(ajustada a + 37° C), SELECTA Mod. 237
- Funda protectora para vagina artificial, I.M.V. Mod. VA 131
- Potro de sujección de la hembra
- Tubos cónicos intermediarios entre vagina artificial y tubo colector, I.M.V.

Mod.VA 132

- Vagina artificial de ovino-caprino, I.M.V. Mod. VA 130

3.1.3. MATERIAL EMPLEADO EN LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN

- Barqueta, I.M.V. Mod. GC 001
- Pajuelas 0,25 ml, I.M.V. Mod. A 201
- Peines de aspiración, I.M.V. Mod. GC 001
- Pinzas con muesca para pajuelas, I.M.V. Mod.F 005
- Rampa horizontal de congelación, I.M.V. Mod. J 005
- Soporte de barqueta, I.M.V. Mod. GC 003
- Soporte de distribución de pajuelas 0,25 ml, I.M.V. Mod.GB 003
- Recipiente criogénico para la congelación de pajuelas, I.M.V. Mod.CD-50
- Recipiente criogénico de almacenamiento de pajuelas, L'AIR LIQUIDE Mod. GT 26
- Termómetro digital, OMEGA Mod. 450ATT
- Visotubos para la distribución de pajuelas, I.M.V. Mod. PA 002
- Vitrina de refrigeración, I.M.V. Mod.G 006

3.1.4. MATERIAL DE LABORATORIO

- Agitador magnético, SCHOTT IBERICA Mod. SBS A-01
- Balanza de precisión, SAUTER Mod. SD 1000T
- Bañomaría, HAAKE Mod. W13
- Cámara de T.V., JAVELIN Mod. J.E. 5520
- Centrífuga, HERAEUS SEPATECH Mod. 2AT
- Cronómetro digital

- Espectrofotómetro, BAUSCH & LOMB Mod. "Spectronic 20"
- Estereomicroscopio, CARL ZEISS Mod. Citoval 2
- Estufa de CO₂, NAPCO Mod. 6100
- Estufa de 37°C, BINDER Mod. WTB
- Filtros de acetato de celulosa de 2 µm, GELMAN
- Microscopio óptico, LEITZ Mod. Ortholux (conectado a un circuito cerrado de TV.)
- Microscopio óptico y de contraste de fases, CARL ZEISS Mod. Standar
- Microscopio de fluorescencia, NIKON Mod. Optiphot-2
- Agitador, IKA Mod. MS1
- Monitor de T.V., SONY Mod. PVM-122 CE.
- Osmómetro, ADVANCED Mod. 3 MO.
- pHmetro, CRISON Mod. Micro/ph 2001.
- Pipeta automática BIOHIT de 5ml graduable de 50 µl
- Pipeta automática BIOHIT de 1000 µl graduable de 5µl
- Pipeta automática EPENDORF de 1000 µl graduable de 1µl
- Pipeta automática FINNPIPETTE DIGITAL de 200 µl graduable de 1µl
- Placa calefactora, MINITÜB Mod. HT 400
- Placas de 4 pocillos, NUCLON Mod.
- Placas petri de 35x10 mm. de diámetro, INTERMED
- Sistema de purificación de agua, MILLIPORE Mod. Milli RO
- Sistema de ultrapurificación de agua, MILLIPORE Mod. Milli-Q Plus 185
- Material fungible de laboratorio: pipetas pasteur de 145 mm, vasos de precipitado, probetas, matraces aforados, termómetros, portaobjetos con y sin visel, cubreobjetos de 18x18 mm y 24x40 mm, viales, papel de parafilm,

3.1.5. MATERIAL QUIMICO

3.1.5.1. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN (Refrigeración y Congelación)

- Acido Cítrico, MERCK 244
- Alcohol de polivinilo, SIGMA P-8136
- BES (Ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), SIGMA B-9879
- Fructosa D(+), MERCK 5323
- Glicerol (d 1;26), RHÔNE-POULENC 24387.29
- Hidroxido potásico (KOH), PANREAC 17722
- Penicilina-G sódica, SIGMA P-3032
- Sulfato de dihidroestreptomicina, SIGMA S-9137
- TRIS (N-Tris(hidroximetil) aminometano), SIGMA T-1378

3.1.5.2. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA TRIPLE TINCIÓN

- Acido cacodílico, SIGMA C-0250
- Azul Tripán, MERCK 11732
- Etanol 96%, PANREAC 141085
- Glutaraldehido al 25%, SERVA 23114
- Marrón Bismark, SIGMA B-5263
- Rosa Bengala, SIGMA R-3877
- Trizma base, SIGMA T-1503

3.1.5.3. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA INDUCCIÓN DE LA R.A.

- Calcio ionóforo A-23187, SIGMA C-7522
- Dimetil Sulfoxido (DMSO), SIGMA D-2650

3.1.5.4. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA TINCIÓN VITAL

- Bromuro de etidio, SIGMA E-8751
- Naranja de acridina, SIGMA A-6014

3.1.5.5. REACTIVOS UTILIZADOS EN EL SISTEMA F.I.V.

- BSA fracción V, SIGMA A-9647
- $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MERCK 5833
- $\text{ClCa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MERCK 2382
- ClK, MERCK 4936
- CO_3HNa , MERCK 6329
- Glucosa anhidra, MERCK 8337
- Hialuronidasa, SIGMA H-3506
- HPO_4Na , MERCK 6586
- Lactato Cálcico $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MERCK 102102
- Lactato de Sodio, SIGMA L-4263
- NaCl, PANREAC 141659
- Piruvato sódico, MERCK 6619
- PO_4KH_2 , MERCK 4873
- Rojo fenol, SIGMA P-5530
- $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MERCK 5886

- Sulfato de dihidroestreptomicina, SIGMA S-9137
- Tripsina, DIFCO 0152-15-9

3.1.5.6. OTROS REACTIVOS

- Ácido clorhídrico, PANREAC 131019
- Agua purificada mediante ósmosis inversa
- Citrato sódico · 2H₂O, MERCK nº 6448
- Glutaraldehído al 25%, MERCK 4239
- Hidróxido sódico, MERCK 6498
- Parafina, SIGMA 400-5
- Permunt, Fisher Scientific, SP15-500

3.2. METODOS

3.2.1. OBTENCIÓN Y CONTRASTACIÓN SEMINAL

Se seleccionaron 5 machos cabríos a partir de un total de 10 animales, transcurrido un periodo de entrenamiento de 3 meses, en base a la libido y características seminales (volumen eyaculado, movilidad masal, movilidad individual, concentración espermática, test de endósmosis positiva, morfoanomalías y normalidad acrosómica).

El semen fue obtenido mediante vagina artificial (Evans y Maxwell, 1989) utilizando una hembra ovariectomizada como estímulo sexual. Los animales fueron sometidos a un régimen sexual de dos recogidas semanales, obteniéndose un sólo eyaculado en cada sesión.

Tras la recogida de los diferentes eyaculados, se procedió al traslado de los mismos al laboratorio mediante una caja de transporte, manteniendo el semen en todo momento en condiciones isotermas $+36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, determinándose de manera rutinaria: volumen eyaculado, movilidad masal, movilidad individual, calidad de movimiento y concentración espermática.

Volumen y Aspecto físico: se evaluó visualmente en el mismo tubo colector graduado donde fue recogido, expresándose en ml. Junto a este parámetro se observaron posibles irregularidades en cuanto al color, olor o aspecto que pudiera presentar algún eyaculado, procediéndose a su eliminación.

Movilidad masal (MM): se valoró la formación y progresión de ondas producidas por la masa espermática en movimiento en una escala de 0 a 5 (**Maxwell y Evans, 1990**). Las ondas fueron observadas mediante microscopio óptico (10x) conectado a un circuito cerrado de T.V. al colocar una gota de semen fresco sin diluir en un portaobjetos atemperado a 37°C (**Derivaux, 1982**).

Movilidad individual (MI): se estimó el porcentaje de espermatozoides en movimiento (de 0 a 100) y la calidad del mismo (C.M.) (de 0 a 5) (**Maxwell y Evans, 1990**). Se observó en una muestra de semen diluido en citrato sódico isoosmótico, entre portaobjetos y cubreobjetos previamente atemperados a 37°C , mediante microscopio óptico conectado a un circuito cerrado de T.V. (10x). El valor de la MI se expresa en porcentaje.

Concentración espermática: se determinó mediante valoración espectrofotométrica (**Sorensen, 1982**). Se diluyen 0,05 ml de semen en 20 ml de citrato sódico isoosmótico (1/400), midiendo el porcentaje de transmitancia de la dilución del semen frente al citrato sódico a una longitud de onda de 540 nm. La concentración seminal se obtiene a partir de una tabla de conversión, asignando a cada valor de

transmitancia un valor de concentración calculado previamente mediante un contador de partículas "Coulter Counter". La concentración se expresa en miles de millones de espermatozoides por ml de eyaculado.

De manera periódica se realizaron otras mediciones de la calidad seminal de los machos cabrios seleccionados: morfoanomalías espermáticas, test de endósmosis positiva (E+) y normalidad acrosómica (NAR).

La estimación del porcentaje de espermatozoides que presentan algún tipo de **morfoanomalías** se realizó mediante la inclusión de una muestra espermática en glutaraldehído al 2% en BL-1, procediéndose al recuento de 100 espermatozoides mediante microscopio óptico (40x).

Los protocolos del test de permeabilidad de membrana y de normalidad acrosómica serán explicados en los apartados 3.2.5.4. y 3.2.5.3. respectivamente.

Finalizada la contrastación seminal, se procedió a la eliminación de todos aquellos eyaculados que no cumpliesen los siguientes requisitos:

Volumen $\geq 0,4$ ml

M.M. ≥ 4

M.I. ≥ 75 % de espz móviles con C.M. ≥ 4

Concentración espermática $\geq 3.000 \times 10^6$ espz/ml

Formas espermáticas normales ≥ 85 %

NAR $\geq \%75$

Con el fin de evitar la acción del factor "estación" y "fotoperíodo" sobre las características seminales del macho cabrio, se procedió a la recogida de datos sobre la

capacitación en semen fresco y refrigerado durante los meses de septiembre a diciembre, alternándose una y otra experiencia. La congelación de las diferentes dosis seminales se realizó también en este mismo período, siendo el estudio del efecto ejercido por los procesos de congelación-descongelación sobre la capacitación espermática realizado durante los meses de febrero a mayo.

3.2.2. CAPACITACIÓN DEL SEMEN FRESCO

3.2.2.1. MEDIO DE LAVADO. PBS-Dm

El PBS de Dulbecco modificado (PBS-Dm) (Tabla 7) ha sido empleado en el lavado espermático previo a la incubación con BWB, y en la manipulación de los ovocitos tras la descongelación.

Tabla 7.- Composición química del PBS-Dm.

NaCl	136,89	mM
KCl	2,68	mM
Na ₂ HPO ₄	8,10	mM
KH ₂ PO ₄	1,46	mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,88	mM
Na Piruvato	0,32	mM
Glucosa	5,55	mM
Rojo Fenol	0,01	mM
Penicilina G Sódica	0,06	g/l
Sulfato de dihidroestreptomicina	0,05	g/l
BSA (Fracción V)	3,00	g/l

El PBS-Dm (en adelante PBS) se esterilizó con filtros de membrana, con un tamaño de poro de 0,22 μm , en cámara de flujo laminar. Los envases se almacenaron en una nevera a $+5^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de tiempo inferior a los 45 días. Previo a su utilización los medios se llevaron a $+37^{\circ}\text{C}$.

3.2.2.2. MEDIO DE CULTIVO. BWV

Se utilizó el medio de Biggers, Whitten y Whittingham (BWV) suplementado con 0,3 % de albúmina sérica bovina (BSA) fracción V (**Tabla 8**) en la recuperación de los espermatozoides móviles mediante "swim-up", preincubación espermática y co-cultivo de gametos (**Biggers, Whitten y Whittingham, 1971**).

Tabla 8.- Composición química del medio BWV

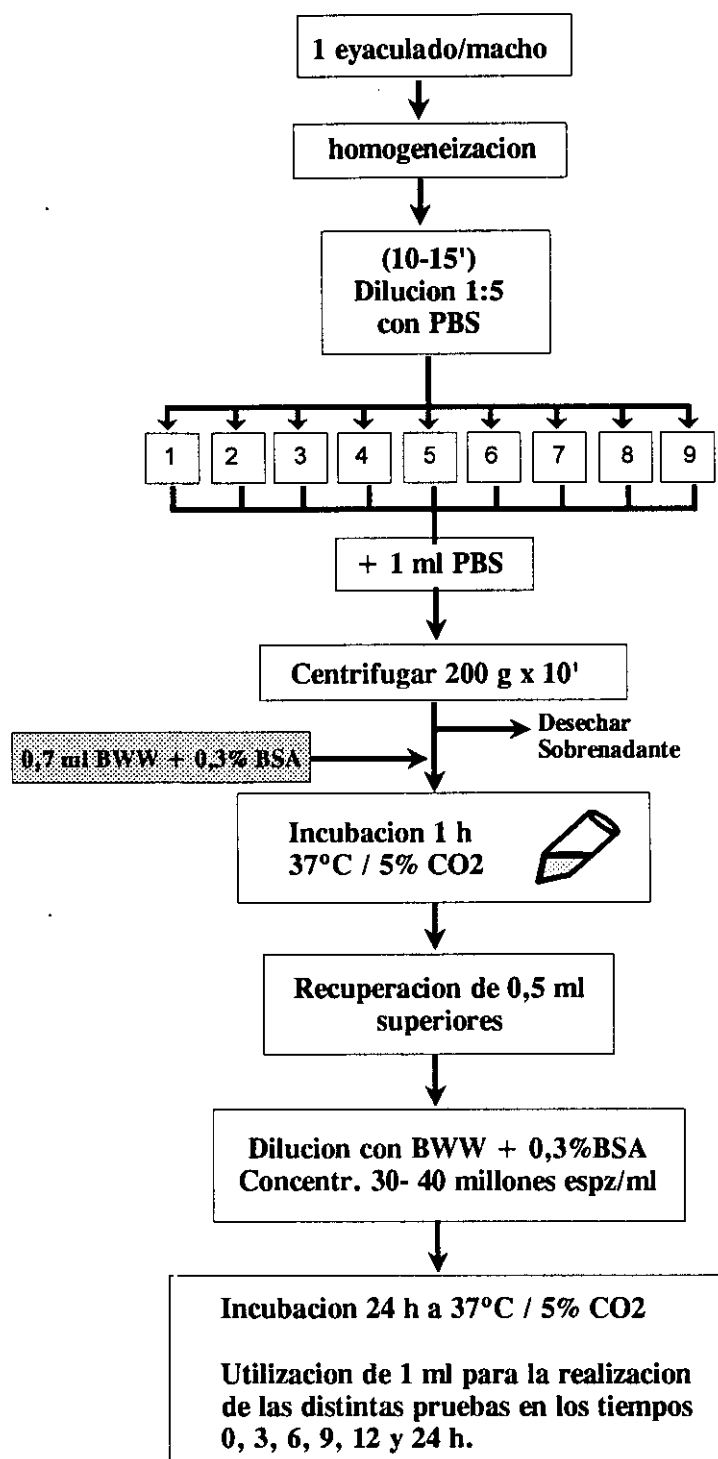
NaCl	94,59	mM
KCl	4,78	mM
Lactato de $\text{Ca}_5\text{H}_2\text{O}$	1,71	mM
KH_2PO_4	1,19	mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,19	mM
NaHCO_3	25,07	mM
Piruvato de Na	0,25	mM
Lactato de Na	21,58	mM
Glucosa	5,56	mM
BSA (Fracción V)	3,00	g/l
Penicilina G Sódica	0,06	g/l
Sulfato de dihidroestreptomicina	0,05	g/l

El BWW se esterilizó mediante su paso a través de filtros de membrana, con un tamaño de poro de 0,22 μm , en una cámara de flujo laminar. Los envases se almacenaron en una nevera a $+5^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de tiempo inferior a los 45 días. Previo a su utilización, el BWW pasa a una estufa (5% CO_2) durante 2 horas para que se equilibre, estabilizando la temperatura y pH a 7,4.

3.2.2.3. CAPACITACIÓN DEL SEMEN FRESCO

Tras la obtención de 5 eyaculados (1 eyaculado/macho) se procedió a la mezcla y homogeneización de los mismos para eliminar el factor individual, realizándose con el total una dilución 1/5 en PBS a los 10-15 minutos de su recogida. El volumen final fue dividido en 9 replicas, procediéndose a la recuperación de los espermatozoides móviles mediante "swi-up". Se añadió 1 ml de PBS a cada alícuota, centrifugándose a continuación a 200 g durante 10 minutos. Tras la separación del sobrenadante se añadieron 0,7 ml de BWW suplementado con 0,3 % de BSA con cuidado de no remover el sedimento. Se incubó en una estufa a $+37^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 durante 1 hora, transcurrida la cuál, se recuperaron los 0,5 ml superiores de cada alícuota y se procedió a su dilución con BWW + 0,3 % de BSA hasta una concentración final aproximada de 30-40 millones de espermatozoides/ml, "tiempo 0" (Esquema 1).

Se tomaron como referencia del estado de capacitación el porcentaje de espermatozoides móviles, calidad de movimiento, porcentaje de espermatozoides vivos, normalidad acrosómica, porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva, porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas de incubación. Para la realización de este experimento fueron utilizados un total de 42 eyaculados, siendo utilizados por término medio 4-5 eyaculados por experiencia.



Esquema 1.- Tratamiento seguido en la capacitacion del semen fresco.

3.2.3. CAPACITACIÓN DEL SEMEN REFRIGERADO

3.2.3.1. DILUYENTES DE REFRIGERACIÓN

Para la determinación del efecto de la refrigeración y congelación sobre la fisiología del espermatozoide caprino fueron utilizados dos diluyentes: a) Tris-Fructosa-Cítrico (TFC) seleccionado a través de la bibliografía por su amplia difusión como medio de conservación de semen en diversas especies, existiendo multitud de variaciones. La composición química del TFC utilizada por nosotros se refleja en la **Tabla 9**; y b) BesKOH, desarrollado en este Área de Reproducción Animal para semen caprino (**Dunner, 1991**) (**Tabla 10**).

Tabla 9.- Composición química del TFC .

<u>Diluyente 1.</u>	
Tris	2,00 g
Fructosa	2,50 g
Ácido Cítrico	0,90 g
Penicilina G Sódica	500.000 UI
Sulfato de dihidroestreptomicina	625 mg/l
Agua purificada	100 ml
<u>Diluyente 2.</u>	
Diluyente 1	100 ml
Glicerol	4,00 ml
Yema de Huevo	5,00 ml
pH	7,2
P.O.	320 mOsm/kg

Tabla 10.- Composición química del BesKOH

Bes	340 mM	KOH	350 mM
pH	4,1	pH	13,15
P.O.	320 mOsm/kg	P.O.	686 mOsm/kg

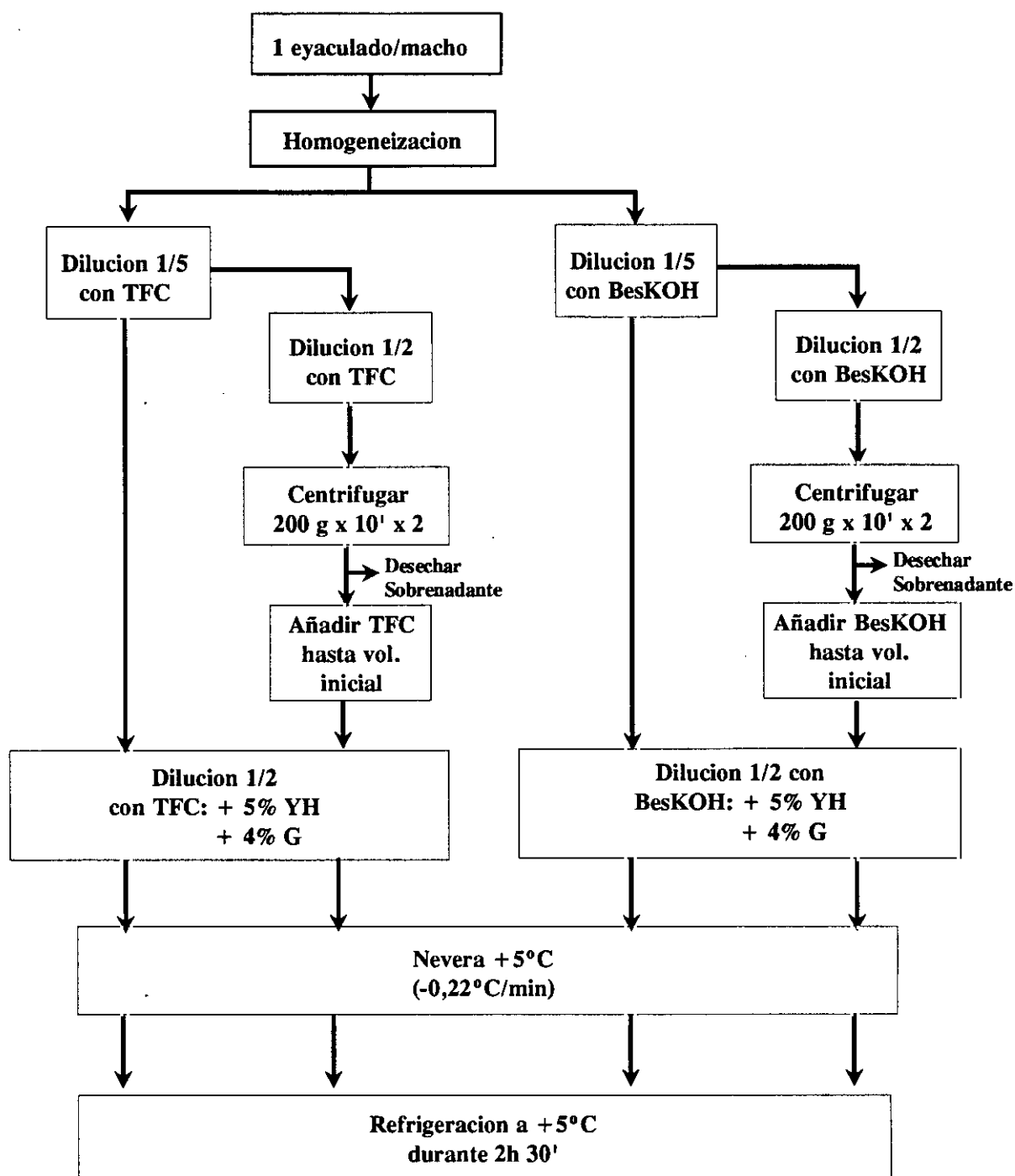
BesKOH	
<u>Diluyente 1.</u>	
Solución Acuosa de Bes (320 mOsm/kg)	72 ml
Solución Acuosa de KOH (686 mOsm/Kg)	28 ml
Penicilina G Sódica	500.000 UI
Sulfato de dihidroestreptomicina	625 mg/l
<u>Diluyente2.</u>	
Diluyente 1	100,00 ml
Glicerol	4,00 ml
Yema de Huevo	5,00 ml
pH	7,2
P.O.	340 mOsm/kg

Los diluyentes para la conservación y criopreservación del semen caprino se utilizan de forma seriada: Diluyente 1 (solución acuosa base): empleado para el lavado seminal y primera dilución (a los 10 minutos); y Diluyente 2 (solución acuosa base con crioprotectores): es el diluyente base al cuál se le ha complementado con crioprotectores, 4% de glicerol y 5% de yema de huevo. Previa adición del glicerol, se realiza una centrifugación del diluyente con el 5% de yema de huevo a 500 g durante 30 minutos.

3.2.3.2. REFRIGERACIÓN DEL SEMEN CAPRINO

Una vez obtenidos 5 eyaculados (1 Eyaculado/macho) y tras una primera valoración seminal se procedió a la mezcla, homogeneización y posterior separación en dos alícuotas. A los 10-15 minutos, cada muestra fue diluida 1/5: una con TFC y la otra con BesKOH (sin yema de huevo ni glicerol). Se separó la mitad del volumen final de cada una, obteniéndose un total de 4 muestras. Una alícuota de cada medio se rediluyó 1/2 con el mismo suplementado con 5% de yema de huevo y 4% de glicerol, dividiendo a su vez en 5 alícuotas y pasando seguidamente a una nevera de +5°C (B y T). Las dos muestras restantes fueron divididos en 5 muestras, a las que se les añadió 0,5 ml de su respectivo medio sin huevo ni glicerol, procediéndose a una doble centrifugación a 200 g durante 10 minutos. Se rediluyó el sedimento hasta su volumen inicial con el diluyente anteriormente utilizado, y se procedió a una dilución 1/2 con su respectivo medio suplementado con 5% de yema de huevo y 4% glicerol. (BC y TC).

Todas las muestras así obtenidas fueron llevadas a la nevera de +5°C (**Esquema 2**). El período de refrigeración se fijó en 2 horas 30 minutos, estimando el tiempo medio requerido por el inseminador desde su salida del centro hasta el momento de la inseminación en las explotaciones más lejanas.



Esquema 2.- Refrigeracion del semen de macho cabrio.

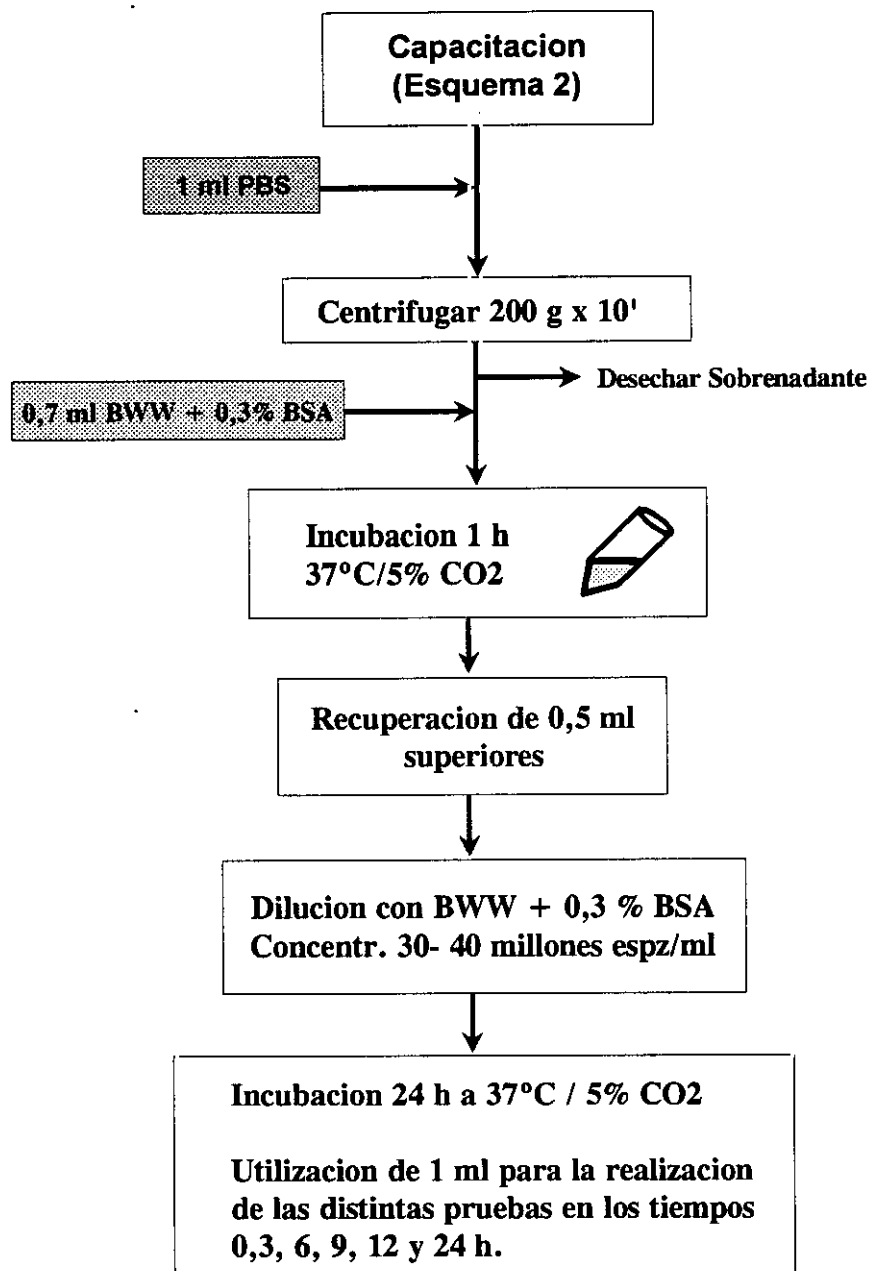
3.2.3.3. CAPACITACIÓN DEL SEMEN REFRIGERADO

Transcurridas 2 horas y 30 minutos de permanencia en la nevera a +5°C (tiempo medio estimado entre la recogida en un centro de inseminación y su aplicación a un rebaño de hembras) todas las alícuotas son centrifugadas a 200 g durante 10 minutos tras la adición de 1 ml de PBS.

Una vez separado del sobrenadante se añadieron 0,7 ml de BWW + 0,3% de BSA y se incubó durante 1 hora en una estufa 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se recuperaron los 0,5 ml superiores de cada alícuota y se procedió a su dilución con BWW + 0,3% de BSA hasta una concentración final aproximada de 30-40 millones de espermatozoides/ml, "tiempo 0" (**Esquema 3**).

Como referencia del estado de capacitación se observaron el porcentaje de espermatozoides móviles, calidad de movimiento, porcentaje de espermatozoides vivos, normalidad acrosómica, porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva, porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma a las 0, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación.

Para la realización de este experimento fueron utilizados un total de 56 eyaculados, siendo empleados por término medio 4-5 eyaculados por día de experiencia.



Esquema 3.- Tratamiento seguido para la capacitacion del semen caprino refrigerado durante 2 h. 30' a +5°.

3.2.4. CAPACITACIÓN DEL SEMEN CONGELADO

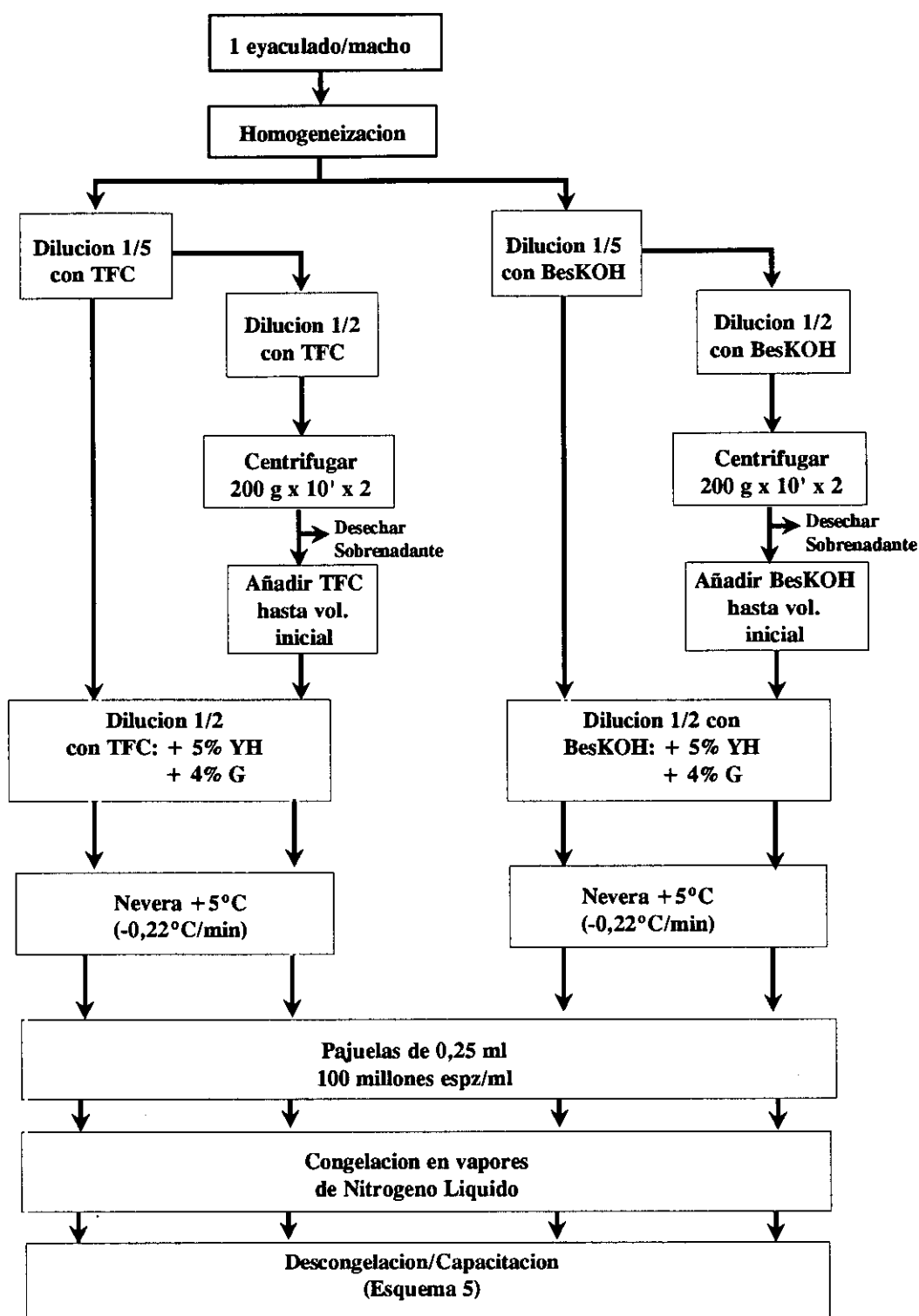
3.2.4.1. DILUYENTES DE CONGELACION

Los diluyentes de congelación aparecen reflejados en las **Tablas 9 y 10**.

3.2.4.2. CONGELACIÓN DEL SEMEN CAPRINO

Tras la obtención, homogeneización y valoración seminal se procedió a la separación del volumen final en 2 alícuotas. Cada una de ellas fue diluida 1/5 a los 10-15 minutos de su recogida con TFC y BesKOH (sin yema de huevo ni glicerol). Ambas muestras se dividieron en dos; una alícuota de cada medio se rediluyó 1/2 con el mismo suplementado con 5% de yema de huevo y 4% de glicerol pasando seguidamente a una nevera de +5°C (B y T). Las otras dos alícuotas fueron diluidas 1/2 con su respectivo medio (sin huevo ni glicerol), procediéndose a una doble centrifugación a 200 g durante 10 minutos. Se rediluyó el sedimento hasta su volumen inicial (previo a la segunda dilución) con el diluyente anteriormente utilizado, y se procedió a una dilución 1/2 con su respectivo medio suplementado con 5% de yema de huevo y 4% glicerol. (BC y TC). Todas las muestras así obtenidas fueron llevadas a la nevera de +5°C. Todas las alícuotas obtenidas se refrigeraron hasta alcanzar una temperatura de +5°C (velocidad de enfriamiento de -0,22°C/min.). En ese momento se procede al envasado en pajuelas de 0,25 ml y a su sellado con alcohol de polivinilo, siendo la concentración espermática media de cada pajuela de 100 millones espz. Las pajuelas son depositadas sobre un soporte horizontal, permaneciendo a +5°C durante 20-30 minutos.

Transcurrido este tiempo se procedió a su congelación en el tanque criogénico. Se congeló en vapores de nitrógeno líquido durante 10 minutos a una distancia de 5 cm del nivel del N₂L. Las pajuelas fueron posteriormente almacenadas en tanques de N₂L hasta el momento de su utilización (**Esquema 4**).



Esquema 4.- Diseño experimental para la congelacion del semen caprino

3.2.4.3. DESCONGELACIÓN DE DOSIS SEMINALES

Las pajuelas fueron descongeladas utilizando un bañomaria a +60 °C durante 8 segundos (velocidad de descongelación: +1.500 °C/min). Se procedió a la contrastación inicial de las pajuelas tras 15-20 minutos a fin de permitir su equilibración. Aquellas dosis con un porcentaje de espermatozoides móviles inferior al 40 % fueron rechazadas.

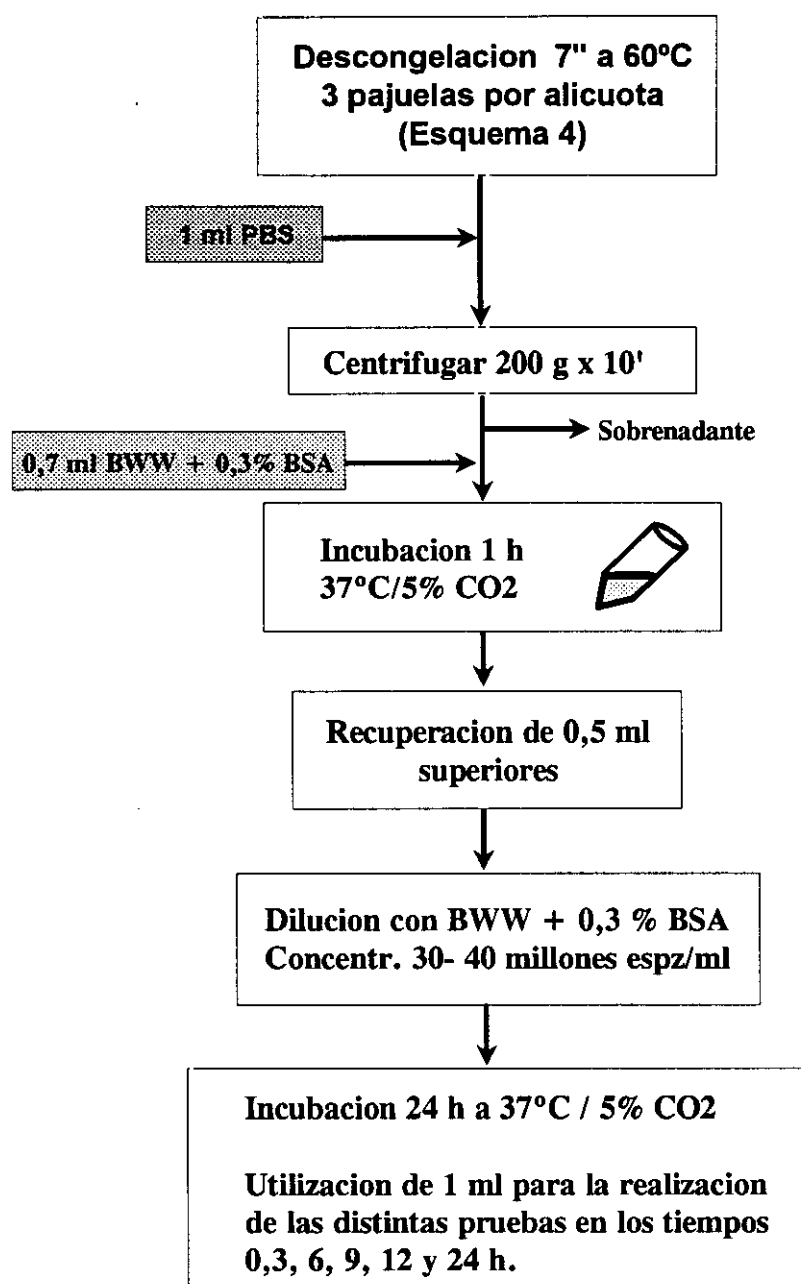
Cada alícuota está formada por el contenido de 3 pajuelas de 0,25 ml.

3.2.4.4. CAPACITACIÓN DEL SEMEN CONGELADO

Tras la descongelación de las pajuelas, todas las alícuotas son adicionadas con 1 ml de PBS procediéndose a continuación a su centrifugación a 200 g durante 10 minutos, decantando el sobrenadante y añadiendo 0,7 ml de BWW + 0,3% de BSA al sedimento. Se incubó durante 1 hora en una estufa 37°C y 5% de CO₂ transcurrido el cual, se recuperaron los 0,5 ml superiores de cada alícuota y se procedió a su dilución con BWW + 0,3% de BSA hasta una concentración final aproximada de 30-40 millones de espermatozoides/ml, "tiempo 0" (**Esquema 5**).

Como referencia del estado de capacitación se reseñaron: porcentaje de espermatozoides móviles, calidad de movimiento, porcentaje de espermatozoides vivos, normalidad acrosómica, porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva, porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma a las 0, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación (**Esquema 5**).

Para la realización de este experimento fueron utilizados un total de 38 eyaculados, siendo utilizados 4-5 eyaculados por día de experiencia.



Esquema 5.- Tratamiento seguido en la capacitacion del semen caprino congelado para cada una de las series segun esquema 4.

3.2.5. CONTRASTACIÓN DEL SEMEN CAPACITADO

3.2.5.1. MOVILIDAD INDIVIDUAL (MI)

3.2.5.1.1. Solución acuosa de citrato sódico isoosmótico

La solución isoosmótica empleada en la determinación de la concentración espermática y valoración de la movilidad individual fue una solución de citrato sódico, siendo ajustada su presión osmótica a 320 ± 3 mOsm/Kg mediante un osmómetro (Tabla 11).

Tabla 11.- Composición química de la solución de citrato isoosmótico.

Citrato Trisódico $\cdot 2H_2O$	34,6	g
Agua purificada	1000	ml
P.O. 320 ± 3 mOsm/kg		

3.2.5.1.2. Protocolo

La MI fue expresada en porcentaje de espermatozoides móviles (0-100%) (E.M.) a la vez que se valoraba la calidad del movimiento desarrollado por los espermatozoides (C.M.) siguiendo la escala propuesta por **Maxwell y Evans (1990)**, siendo el valor 0 correspondiente de acinesis total y el 5 a un movimiento progresivo rápido y lineal.

La determinación de estos parámetros se realizó en una gota de $3\mu\text{l}$ de semen diluido en citrato isoosmótico, entre porta y cubreobjetos atemperados a $+37^\circ\text{C}$, observándose en un microscopio óptico en campo claro conectado a un circuito cerrado de T.V. con un objetivo de 10x.

3.2.5.2. INDICE DE VITALIDAD

3.2.5.2.1. Solución de trabajo de Naranja de acridina

Para la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos se utilizó la tinción vital de Naranja de Acridina (Ichimura et al., 1971; Stockert et al., 1991; Hoshi et al., 1996). El tipo de fluorescencia emitida por el naranja de acridina depende de la existencia de enlaces tioles/disulfuros presentes en las protaminas nucleares que se asocian al ADN (Kosoxer et al., 1992). Dicho fluorocromo se intercala en la doble hélice de ADN (asociada a protaminas ricas en enlaces disulfuros) como monómero, generando una fluorescencia que oscila del verde al amarillo. Tras la desnaturalización de la doble hélice (asociada a protaminas ricas en enlaces tioles), el naranja de acridina se une formando agregados, generando una fluorescencia que varía del naranja al rojo.

La solución patrón (Tabla 12) de Naranja de acridina (Tejada, 1984) fue repartida en alícuotas de 1 ml y almacenada a -20°C, siendo llevada a temperatura ambiente en el momento de la realización de la solución de trabajo. La solución patrón fue diluida 1/100 en PBS sin rojo Fenol ni BSA, siendo esta solución de trabajo envasada en cristal topacio a +5°C durante un máximo de 30 días.

Tabla 12.- Composición química de la solución patrón y de trabajo para la tinción vital (Naranja de acridina).

Solución Patrón	Naranja de Acridina	15	mg
	Etanol	1	ml
	Agua purificada	50	ml
Solución de trabajo	Solución Patrón	1	ml
	PBS (sin BSA ni Rojo F.)	100	ml

3.2.5.2.2. Protocolo

Se tomaron 200 μ l de cada alícuota de semen y se incluyeron en 200 μ l de solución de trabajo, procediéndose inmediatamente al recuento de 200 espermatozoides en un microscopio de fluorescencia con un filtro B-2A a 40x. El tiempo de observación por campo fue inferior a los 30 segundos. Los espermatozoides se clasificaron en dos categorías en base a la fluorescencia emitida (**Lámina 1**):

- * verde- amarillo, espermatozoides con ADN intacto, "vivos".
- * naranja-rojizo, espermatozoides con ADN desnaturalizado, "muertos".

Los espermatozoides que muestran una doble coloración (verde y rojo) en la cabeza son contabilizados como espermatozoides con ADN desnaturalizado.

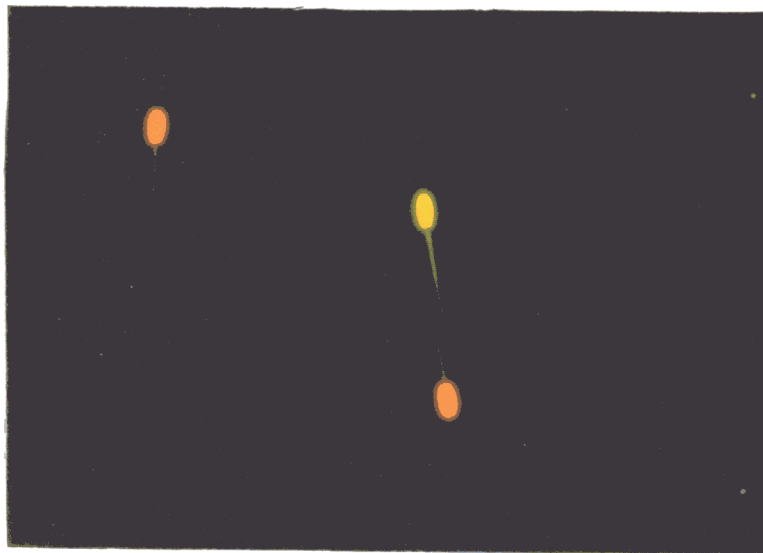


Lámina 1.- Tinción vital: Naranja de Acridina. El color verde es indicativo de ADN intacto, mientras que el rojo lo es de ADN desnaturalizado.

3.2.5.3. ESTATUS ACROSOMAL

3.2.5.3.1. Glutaraldehído al 2% en BL-1

Para la realización de la solución de trabajo se mezclaron 8 ml de Glutaraldehído al 25% con 92 ml de solución BL-1 (Tabla 13).

Tabla 13.- Composición química del BL-1 (Pursel y Jonhson, 1974).

Glucosa monohidratada	2,9	g
Citrato Trisódico $\cdot 2H_2O$	1,0	g
Bicarbonato Sódico	0,2	g
Agua Purificada	100,0	ml

3.2.5.3.2. Protocolo

El estado del acrosoma se determinó tras la inclusión de 200 μ l de las diferentes muestras en 200 μ l de glutaraldehído al 2% en BL-1 (Vázquez et al., 1984 a), examinándose posteriormente un total de 200 espermatozoides por medio de un microscopio de contraste de fases a 40x. Los espermatozoides fueron clasificados atendiendo a su integridad acrosómica (Lámina 2):

- * espermatozoides con acrosoma intacto ("normalidad acrosómica", NAR)
- * espermatozoides con acrosoma degenerado o perdido.

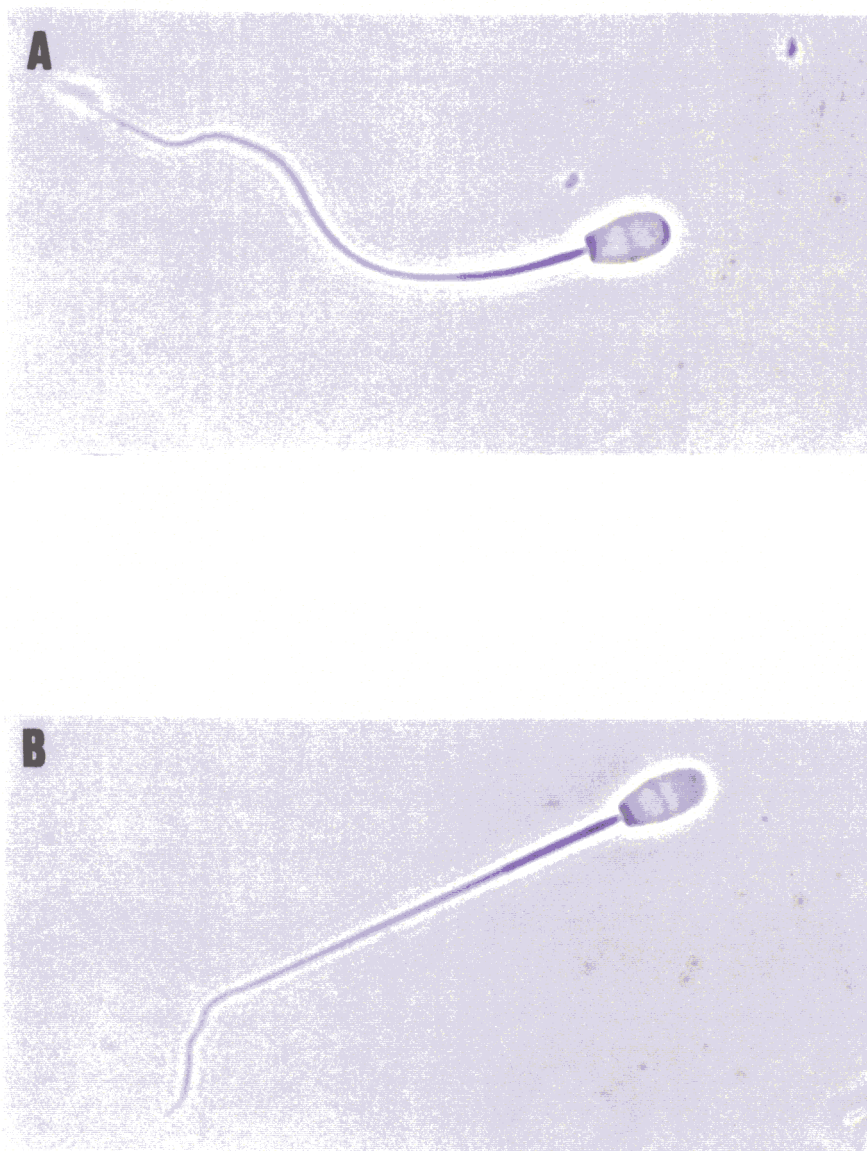


Lámina 2.- Determinación del porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal mediante microscopía de contraste de fases (100x). **A)** Espermatozoide con acrosoma; **B)** Espermatozoide sin acrosoma.

3.2.5.4. TEST DE PERMEABILIDAD DE MEMBRANA

3.2.5.4.1. Solución hipoosmótica

Se utilizó una solución hipoosmotica de citrato sódico (100 mOsm/Kg) (Tabla 14) para la determinación del porcentaje de endósmosis. La solución empleada fue almacenada a +5°C durante un periodo no superiora los 30 días.

Tabla 14.- Composición química de la solución de endósmosis.

Citrato Trisodico ·2H ₂ O	1	g
Agua purificada	100	ml
P.O.: 100 ± 3 mOsm/Kg		

3.2.5.4.2. Protocolo

La determinación de la integridad de la membrana plasmática consiste en someter al espermatozoide a una solución hipoosmótica, provocando el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior de la célula espermática para lograr el equilibrio osmótico. La prueba de endósmosis varía en cuanto a la P.O. de la solución y tiempo de exposición de los espermatozoides a la misma, dependiendo de la especie utilizada: verraco y morueco (Vázquez, 1980), humano (Jeyendran, 1984), conejo (Gafo, 1992) y caprino (Cortés, 1994).

Se mezclaron 200 µl de cada alícuota con 200 µl de la solución hipoosmótica de 100 mOsm/kg durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se fijaron

mediante la inclusión de las mismas en glutaraldehído al 2% en BL-1. Se observó el porcentaje de espermatozoides con torsión de la cola parcial (endósmosis parcial: $E+p$) y total (endósmosis total: $E+t$), así como los que no sufrieron ningún cambio morfológico a nivel del flagelo espermático.

Se contabilizaron un total de 200 espermatozoides por muestra mediante la utilización de un microscopio de contraste de fases a 40x, expresando el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva total + parcial ($E+$) (**Lámina 3**).

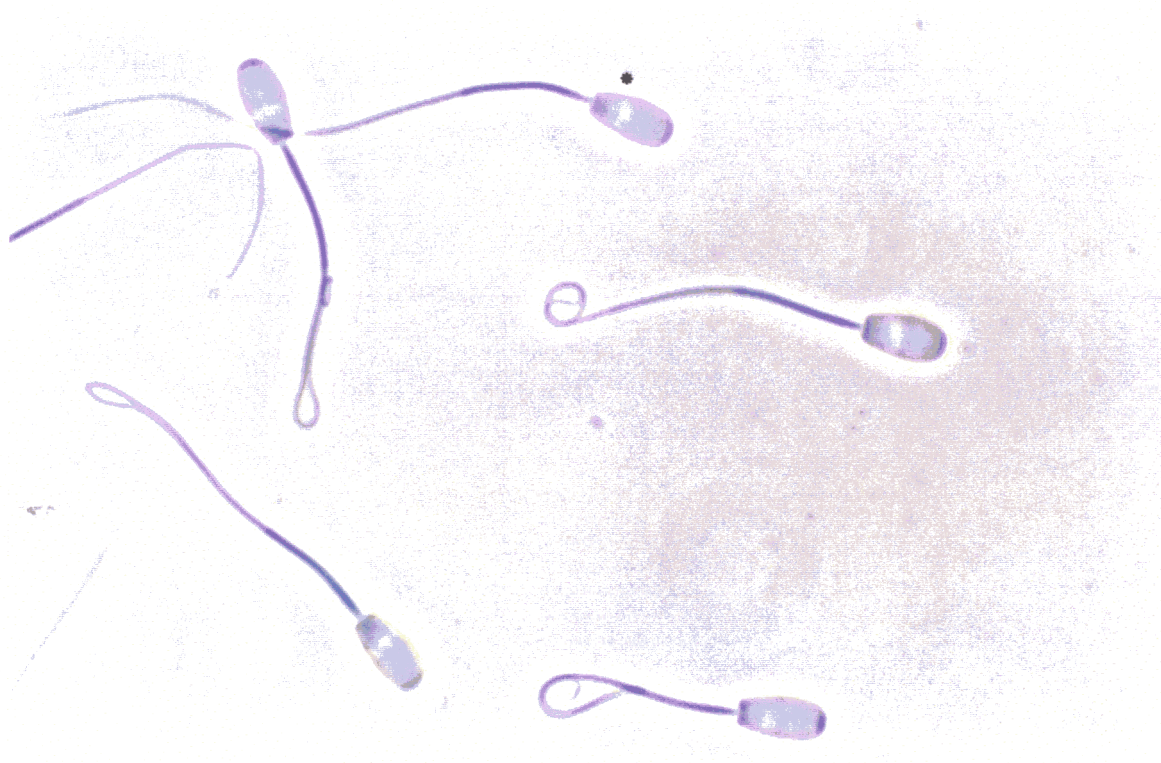


Lámina 3.- Determinación del porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva mediante microscopía de contraste de fases (100x). Espermatozoide con endósmosis negativa (*); Espermatozoides en distintos grado de endósmosis (Sin marca).

3.2.5.5. TRIPLE TINCIÓN

3.2.5.5.1. Colorantes empleados en la triple tinción

El pH de todos los colorantes utilizados en esta tinción es ajustado mediante la utilización de CIN(1N) y/o NaOH (1N). El Tripan Azul se ha de preparar el mismo día de su utilización. El resto de los colorantes son almacenados a +5°C en una nevera por un tiempo no superior a los 15 días. La **Tabla 15** refleja la composición química de todos los colorantes empleados en la técnica descrita por **Talbot y Chacon (1981)** y adaptada por **Garde (1992)** a semen ovino.

Tabla 15.- Composición química de los colorantes empleados en la Triple Tinción.

TRIPAN AZUL	Tripan Azul	0,1 g
	BWW (sin BSA)	10,0 ml
CACODILATO	Glutaraldehido (25%)	12,00 ml
	Ac. Cacodílico	2,14 g
pH: 7,2	Agua Ultrapura	88,00 ml
MARRON BISMARCK	Alcohol-etílico	30,0 ml
	Marron Bismack	0,8 g
pH: 2,8	Agua Ultrapura	70,0 ml
ROSA DE BENGALA	Tris	1,2 g
	Rosa de Bengala	0,8 g
pH: 5,3	Agua Ultrapura	100,00 ml

3.2.5.5.2. Protocolo

Se empleó la triple tinción adaptada por **Garde y col. (1992)** a semen de morueco como técnica para la determinación de la vitalidad espermática y estatus acrosomal.

Para la realización de dicha tinción se mezclaron 200 µl de cada muestra con 200 µl de tripán azul al 1% en BWW y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Tras el periodo de incubación se realizó una extensión sobre un portaobjetos desengrasado y precalentado, dejándolo secar al aire. Una vez secas se fijan a temperatura ambiente en una solución de glutaraldehído al 3% tamponada con cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,2) durante 30 minutos. Los portas son lavados con agua destilada y se dejan secar al aire, siendo introducidos a continuación durante 10 minutos en una solución de marrón Bismark al 0,8% a +41°C (pH 2,8). Tras un nuevo lavado con agua destilada se dejan secar al aire para pasar a una solución de rosa de Bengala al 0,8% (pH 5,3) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a un nuevo lavado y secado de todas las preparaciones al aire para su posterior montaje en Permount. Se contabilizaron un total de 100 espermatozoides clasificándolos en cuatro categorías según su vitalidad y estatus acrosomal dependiendo de su tonalidad (**Lámina 4**):

1. Región acrosomal rosa y post-acrosomal ligeramente marrón:
espermatozoide vivo con acrosoma intacto (VA).
2. Región acrosomal y post-acrosomal ligeramente marrón:
espermatozoide vivo con acrosoma reaccionada (VR).
3. Región acrosomal rosa y post-acrosomal marrón oscuro:
espermatozoide muerto con acrosoma intacto (MA).
4. Región acrosomal y post-acrosomal marrón oscuro:
espermatozoide muerto con acrosoma reaccionado (MR).

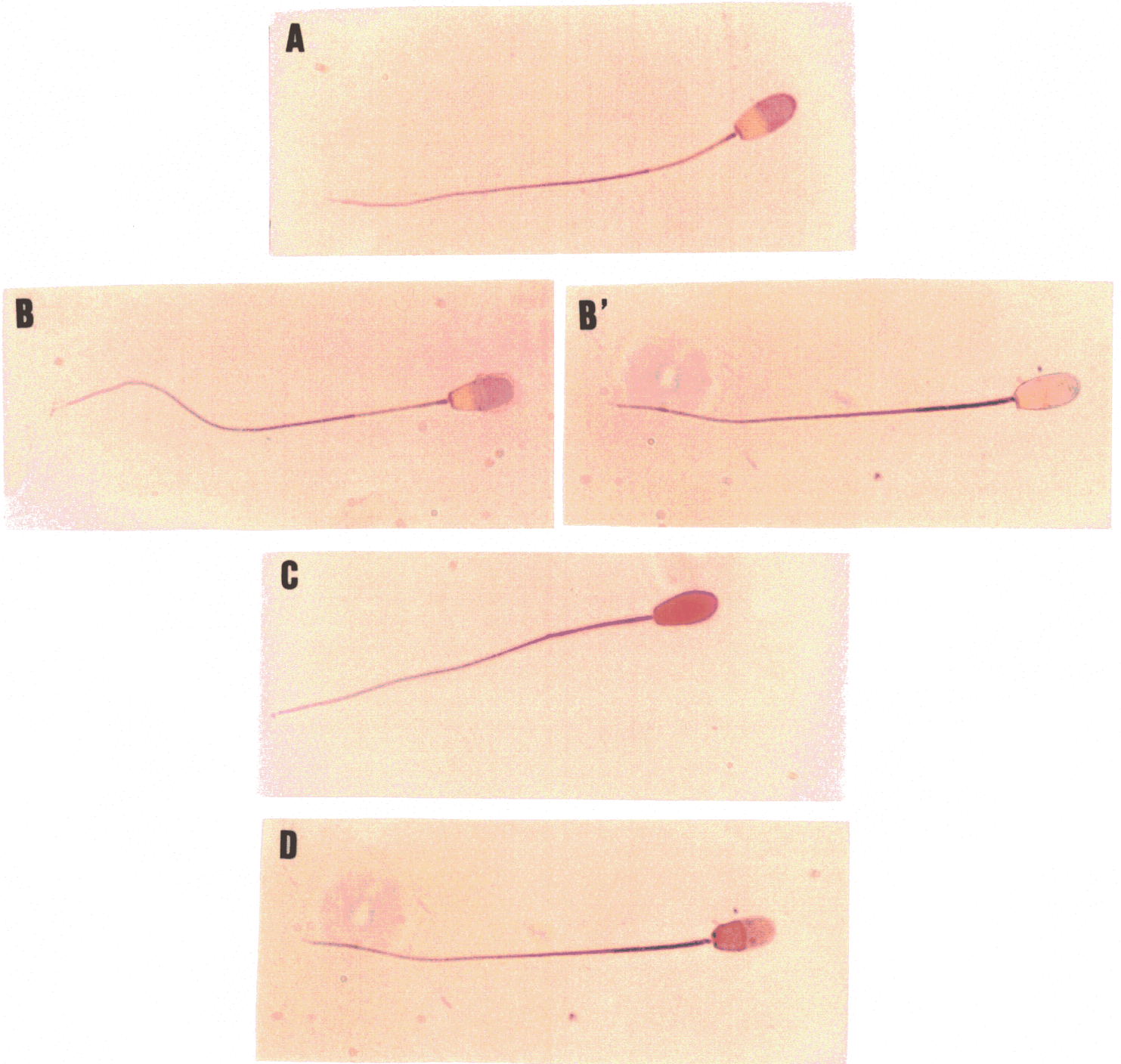


Lámina 4.- Determinación del porcentaje de espermatozoides viables y estado acrosomal mediante la triple tinción (100x): **A)** espermatozoide vivo con acrosoma intacto (VA); **B)** espermatozoide vivo con acrosoma reaccionando (VR); **B')** espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado (VR); **C)** espermatozoide muerto con acrosoma intacto (MA) y **D)** espermatozoide muerto sin acrosoma.

3.2.6. INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA

3.2.6.1. Ca^{2+} -IONÓFORO. SOLUCIÓN DE TRABAJO.

Se realizaron alícuotas (100 μl) de la solución patrón Ca^{2+} ionóforo (Sigma C-7522) 1 mM y solución control (DMSO) (Tabla 16), siendo congeladas a -20°C hasta el momento de su utilización. Tras la descongelación, dichas alícuotas son diluidas 1/10 en BWW + 0,3% BSA, resultando la concentración final de Ca^{2+} ionóforo utilizada en la inducción de la reacción acrosómica de 1 μM .

Tabla 16.- Composición química del Ca^{2+} ionóforo 1 mM y solución control.

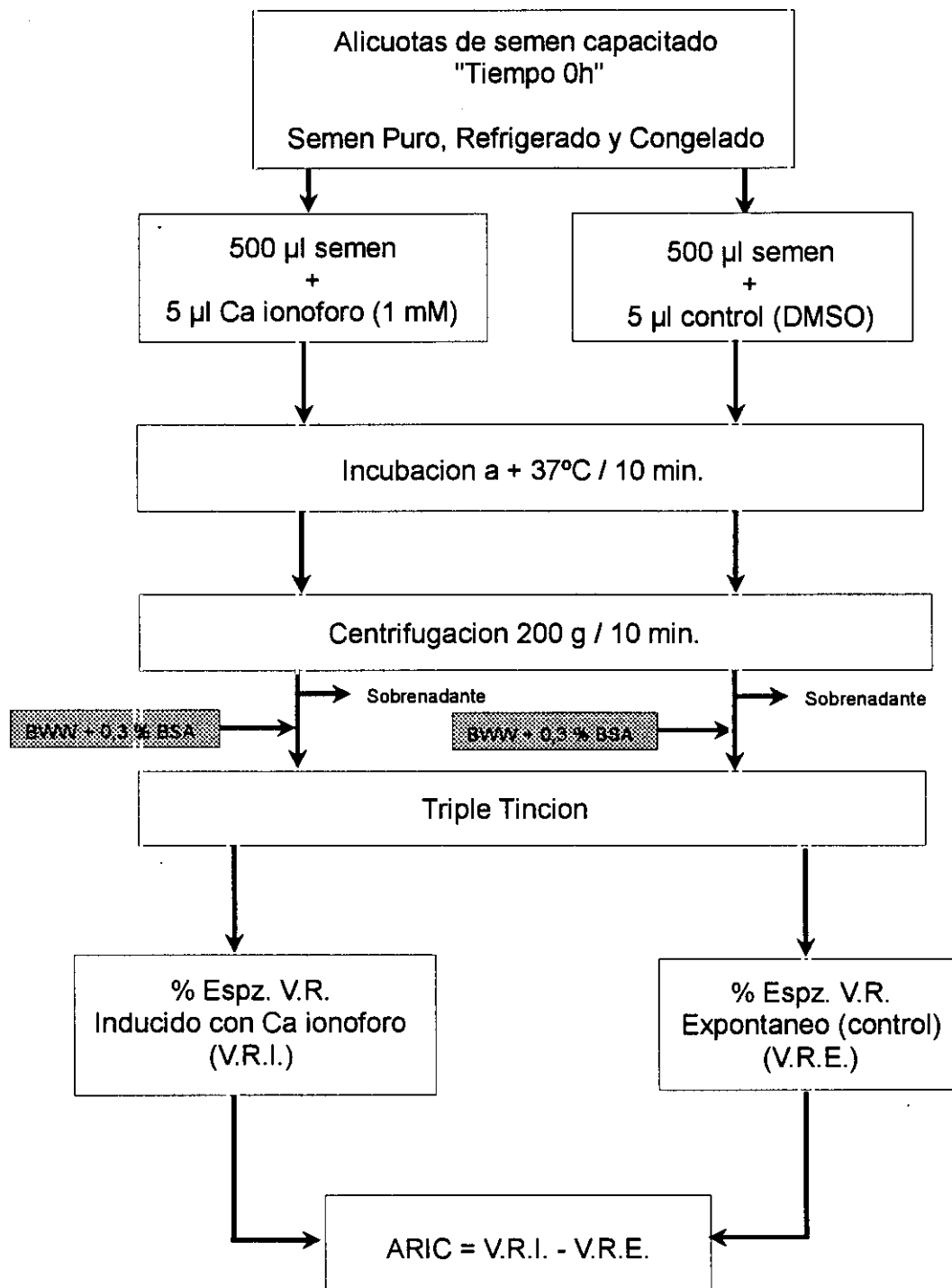
1 mM	Ca^{2+} ionóforo DMSO	1,04 mg 100 μl
Control	DMSO	100 μl

3.2.6.2. Protocolo

Para la determinación de la inducción de la reacción acrosómica por el calcio ionóforo se utilizó el test A.R.I.C. (Acrosome Reaction to Ionophore Challenge) (Cummins et al., 1991). Tras la capacitación de las distintas muestras (tiempo 0h) de semen heterospérmico (fresco, refrigerado y congelado) e individual, se procedió a la realización de cuatro alícuotas de 500 μl con una concentración aproximada de 30-40 millones de espz/ml.

Se adicionó 5 μ l de Ca^{2+} ionóforo A23187 (1mM) (concentración final 1 μ M) a tres alícuotas, siendo la cuarta suplementada con 5 μ l de solución control, procediéndose a continuación a la homogeneización e incubación en bañomaria a +37°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 10 minutos a 200 g. Se separó el sobrenadante y se añadió 100 μ l de BWW nuevo suplementado con 0,3 % BSA al sedimento (**Esquema 6**).

Se valoró la vitalidad y estatus acrosomal mediante la Triple Tinción de las distintas alícuotas. El porcentaje de espermatozoides inducidos se obtiene de la diferencia entre los V.R. obtenidos en la muestra con Ca^{2+} ionóforo A23187 y el control.



Esquema 6.- Diseño experimental seguido en el estudio de la reaccion acrosomica inducida y expontanea.

3.2.7. TEST DE HAMSTER

Para la realización del test de hamster (T.H.) ó S.P.A. (Sperm Penetration Assay) fueron utilizados ovocitos congelados de hamster dorado obtenidos a partir de hembras superovuladas con PMSG y HCG. Los ovocitos, libres de células del cumulus, se presentan en pajuelas de 0,25 ml, realizando su descongelación aproximadamente 30 minutos antes de su utilización.

3.2.7.1. DESCONGELACIÓN DE OVOCITOS

Las pajuelas pasaron de su lugar de almacenamiento, tanques criogénicos con nitrógeno líquido (-196°C), a temperatura ambiente durante 40 segundos, y seguidamente a un bañomaría a $+37^{\circ}\text{C}$ durante otros 40 segundos. Se procedió al vaciado del contenido de la pajuela en uno de los pocillos de las placas Nuck, permaneciendo a temperatura ambiente durante 15 minutos (**Lámina 5**).

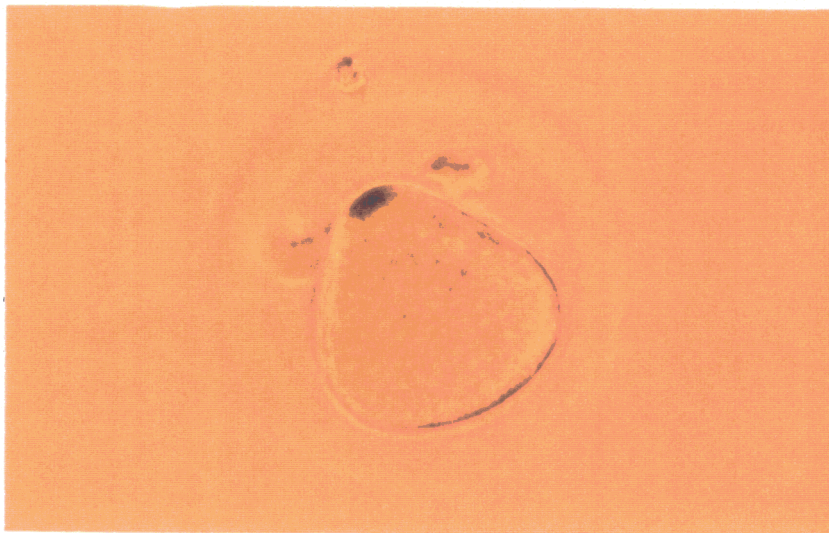


Lámina 5.- Ovocito de hamster inmediatamente tras su descongelación (40x). Se observa una conformación anómala del citoplasma debida a la deshidratación sufrida por dicha célula durante los procesos de congelación.

3.2.7.2. Protocolo

Transcurrido el tiempo de descongelación-equilibración y mediante control estereomicroscópico se eliminan aquellos ovocitos que no presenten membrana pelúcida íntegra, citoplasma esférico y primer corpúsculo polar liberado. Los ovocitos seleccionados son lavados tres veces en PBS con el objetivo de eliminar posibles restos del diluyente de congelación. Posteriormente son sometidos a la degradación de la membrana pelúcida por inclusión de los mismos en tripsina al 0,1% en PBS durante 1-2 minutos (**Lámina 6**). A continuación se lavan de nuevo en PBS y pasan en grupo de 9-12 en placas petri en microgotas de 300 μ l de BWW+0.3% BSA cubiertas por aceite de parafina.

Se procede a la inseminación de los ovocitos añadiendo 3 μ l de cada muestra seminal (concentración aproximada de 30×10^6 espz/ml), procedente de los diferentes tratamientos espermáticos utilizados, a la microgota.

Tras el co-cultivo durante 4-5 h. a 37°C / 5% CO₂ en atmósfera saturada de humedad se procede al control de fertilización de los ovocitos inseminados. Mediante una lupa binocular se procede a la aspiración y doble lavado de los ovocitos en BWW fresco con el objeto de eliminar el exceso de espermatozoides adheridos a la membrana citoplasmática (**Lámina 6**). Los ovocitos son de nuevo agrupados y transferidos a un portaobjetos (desengrasado en alcohol eter), situándolos en posición central, procurando de arrastrar la mínima cantidad de medio. El cubreobjetos se coloca y presiona alternativamente, previa adición de vaselina en las cuatro esquinas, sobre el portaobjetos hasta que los ovocitos se comprimen lo suficiente para poder ser analizados mediante un microscopio de contraste de fases (x1000). Se marca la posición de cada ovocito en el porta con ayuda de la lupa para facilitar su posterior observación en el microscopio (**Esquema 7**).

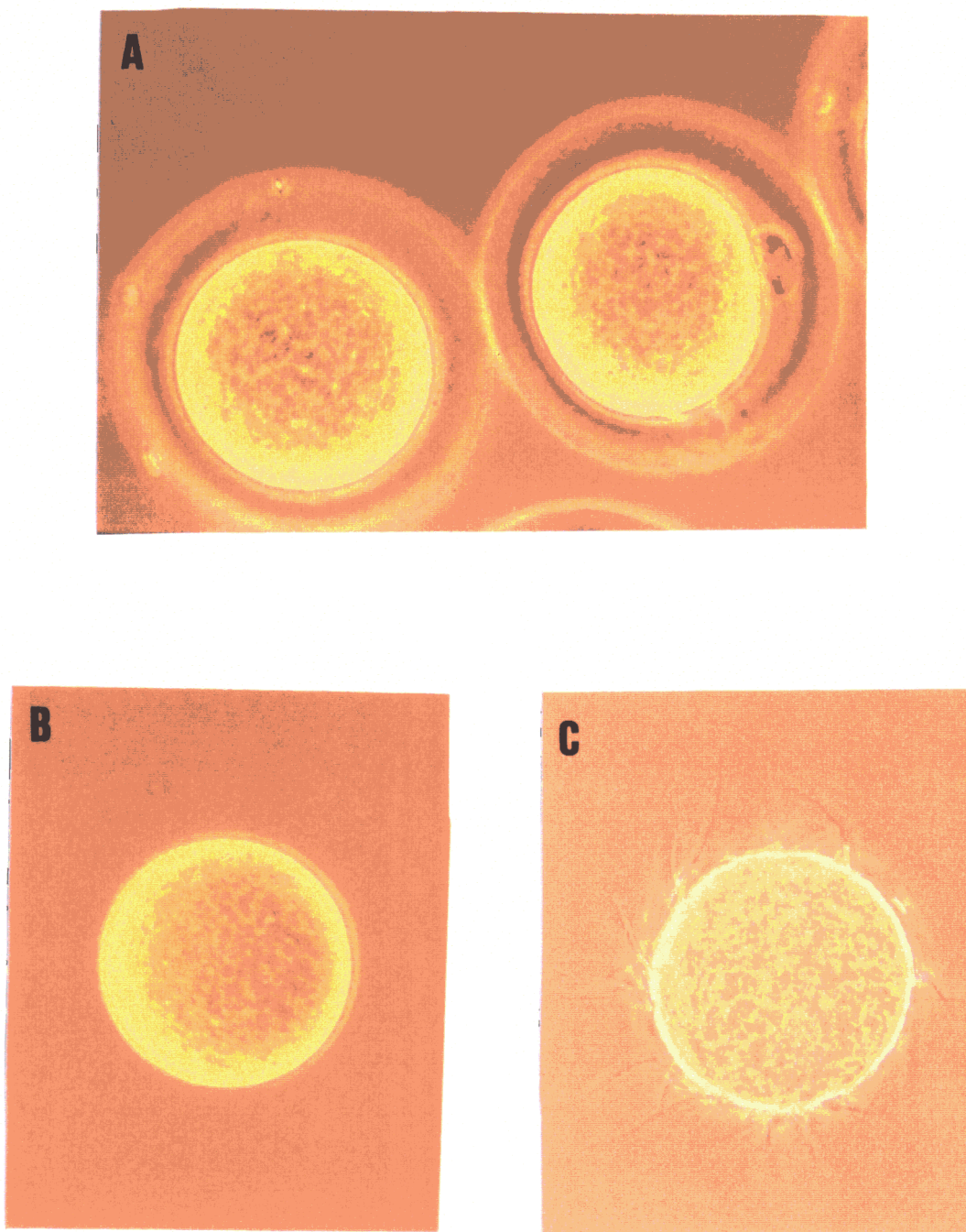
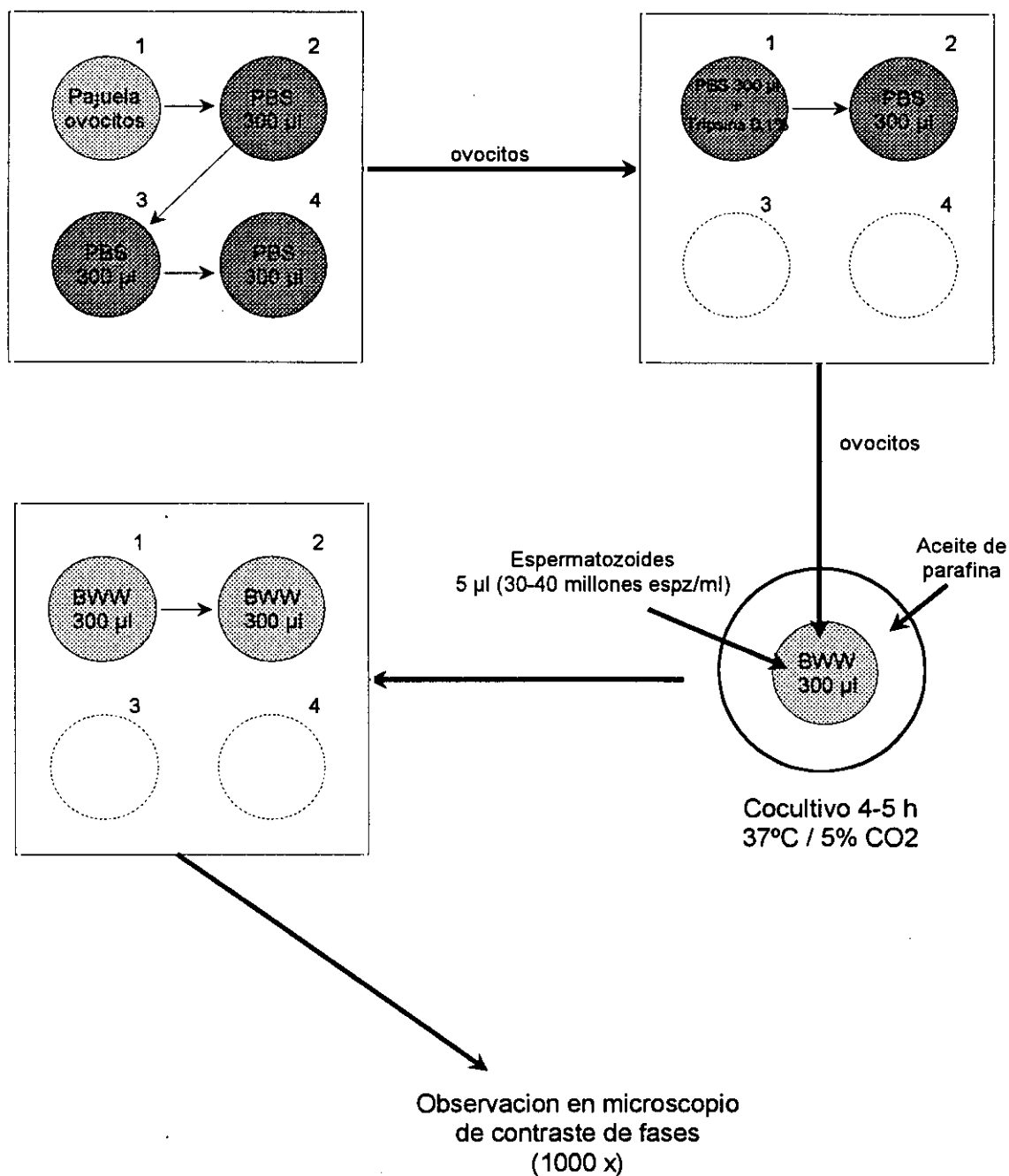


Lámina 6.- Ovocitos de hamster tras el período de equilibración. Visualización en microscopía de contraste de fases a 100x. **A)** Ovocitos con zona pelúcida intacta y segundo corpúsculo polar liberado; **B)** Ovocitos sin zona pelúcida tras su tratamiento con tripsina al 0,1% y **C)** Ovocito con espermatozoides adheridos.



Esquema 7.- Tratamiento seguido en la Fecundación "in vitro" de ovocitos congelados de hamster con semen caprino.

Se consideró como ovocitos penetrados aquellos que presentaban en su citoplasma cabezas hinchadas o pronúcleos masculinos acompañados de colas espermáticas visibles. Es frecuente apreciar varias cabezas de espermatozoides en el interior de un mismo ovocito, ya que, al eliminar la zona pelúcida, estamos eliminando la barrera contra la polispermia (**Lámina 7**).

Es fundamental contabilizar como fecundados únicamente aquellos ovocitos con pronúcleos que poseen una cola asociada o identificable en una región próxima a ellos, ya que los ovocitos de hamster presentan una elevada predisposición a la activación partenogénica y , por tanto, la presencia de núcleos o micronúcleos en su interior no presupone que sean debidos a una fertilización.

Del estudio de los resultados en el TH se estudiaron dos valores:

* *Porcentaje de penetración (PP)*: Porcentaje de ovocitos que contienen en su citoplasma una o más cabezas descondensadas y/o pronúcleos masculinos con cola identificable en relación al número total de ovocitos examinados.

* *Índice de penetración (IP)*: Número total de cabezas descondensadas y/o pronúcleos masculinos con cola identificable dividido entre el número de ovocitos penetrados. Es indicativo del grado de polispermia.

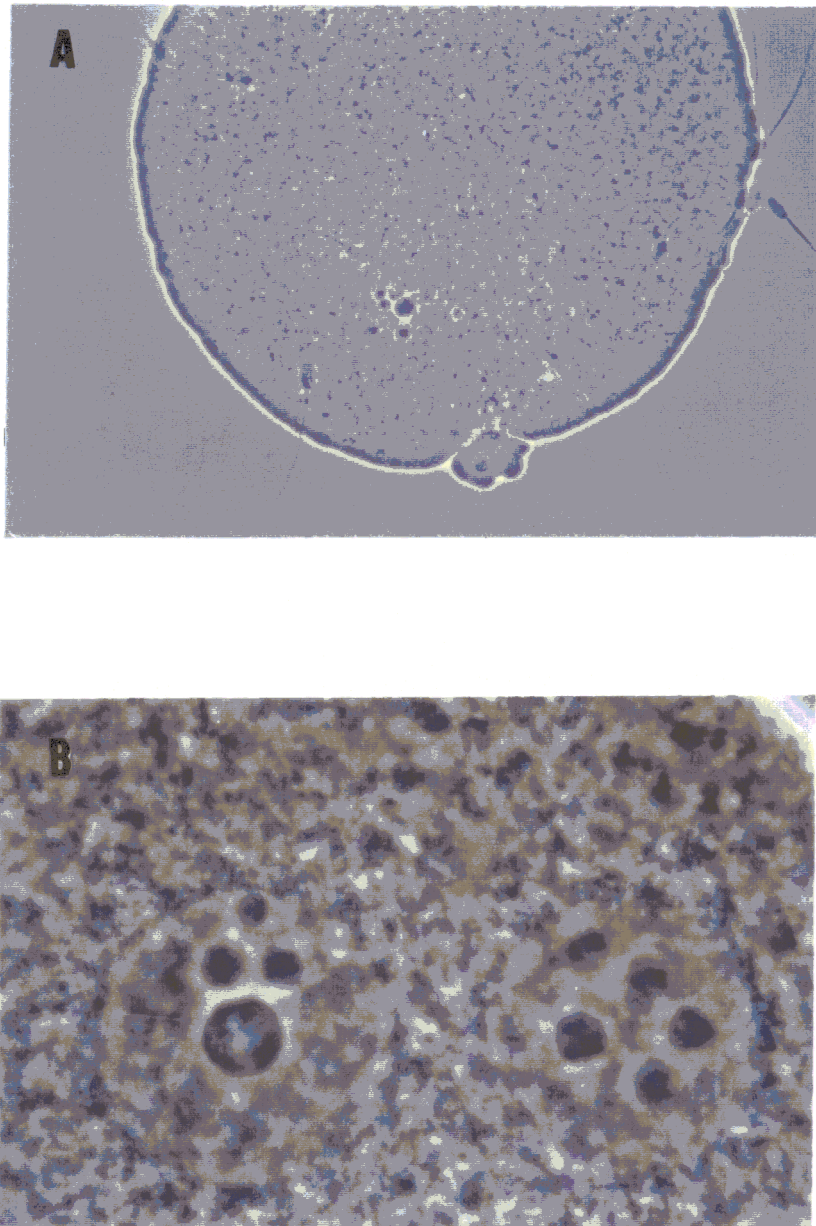


Lámina 7.- Penetración de espermatozoides de macho cabrío en ovocitos de hamster dorado: **A)** Ovocito con segundo corpúsculo polar liberado; **B)** Ovocito con dos pronúcleos presentes en su citoplasma.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.1. Experiencia 1: Efecto de los procesos de conservación del semen caprino sobre su perfil de capacitación y viabilidad espermática "in vitro".

En esta primera experiencia se pretende estudiar el efecto ejercido por la refrigeración y congelación sobre la capacitación y viabilidad espermática. Como primer objetivo se plantea la determinación de la curva de capacitación en semen fresco heterospermico caprino durante 24 horas según el apartado 3.2.2.. La observación del porcentaje de espermatozoides móviles, calidad de movimiento, índice de vitalidad, estatus acrosomal, test de permeabilidad de membrana y triple tinción (apartado 3.2.5.) son utilizados como métodos de diagnosis del estado de capacitación del semen caprino durante todo el período de capacitación.

Como segundo objetivo dentro de esta experiencia se plantea estudiar el efecto ejercido por las bajas temperaturas durante la refrigeración (+5°C) y congelación (-196°C), así como por los diferentes diluyentes y metodologías (con o sin centrifugación) (apartado 3.2.3. y 3.2.4.) sobre la curva patrón de capacitación del semen fresco previamente establecida, estudiándose los mismos parámetros que para el semen fresco heterospermico

3.3.2. Experiencia 2: Efecto inductor del Ca²⁺ ionóforo sobre la reacción acrosómica en semen caprino heterospermico fresco, refrigerado y congelado (test Aric).

Con este estudio se pretende conocer la influencia del ionóforo A23187 sobre la capacitación espermática del macho cabrio en diferentes condiciones de conservación (refrigeración y congelación) mediante el test ARIC (apartado 3.2.6.). La valoración de

dicho test se realizó mediante la triple tinción (apartado 3.2.5.5.), considerando la variable “espermatozoides vivos reaccionados” como la de mayor relevancia debido a sus implicaciones durante la fecundación.

La influencia de los diferentes diluyentes así como los métodos de refrigeración (apartado 3.2.3.) y congelación (apartado 3.2.4.) empleados en este estudio son analizados mediante esta técnica frente a los resultados obtenidos en el semen fresco.

3.3.3. Experiencia 3: Fecundación “in vitro” en semen caprino capacitado. **Correlación con otras técnicas laborales:**

El objetivo de esta experiencia fue determinar el grado de fecundación “in vitro” a partir de espermatozoides capacitados de macho cabrío mediante la utilización del test de hamster (apartado 3.2.7.). Esta experiencia se realizó utilizando semen fresco, refrigerado y congelado a fin de determinar el efecto ejercido por los procesos de conservación espermática sobre la fusión gamética.

A partir de los resultados obtenidos se establecieron las posibles correlaciones existentes entre el resto de las variables laborales y el TH.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados encontrados en este estudio están representados en las diferentes tablas mediante la media \pm error estándar, apareciendo entre paréntesis el valor del coeficiente de variación, siendo este parámetro indicativo del porcentaje de la población representado por la media.

El estudio estadístico de los distintos experimentos planteados se realizó el programa estadístico SIGMA. Se empleó el análisis de varianza como método de estimación de la variabilidad y significancia existente entre las distintas variables aplicadas, siendo la técnica de *Scheffé* la utilizada para realizar comparaciones múltiples, ya que es válida para el caso de que las distintas muestras no tengan el mismo tamaño, estando concebida para todo tipo de contrastes, incluidas combinaciones lineales de medias. Para el análisis específico de determinadas condiciones, se procedió a la realización de una comparación bilateral de medias mediante la *t de Student*.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Los resultados se han dividido en tres apartados acordes con las experiencias planteadas en el capítulo anterior, aplicando en cada caso la metodología. En el primer experimento se analiza la influencia de la refrigeración y congelación (utilizando diversos diluyentes y técnicas), sobre el patrón de capacitación de espermatozoides de macho cabrío. En un segundo bloque, se estima la inducción de la reacción acrosómica en células espermáticas mediante la utilización del test ARIC, así como el efecto ejercido por los procesos de conservación espermática sobre dicha inducción. Por último, se analizan los resultados encontrados en la prueba de fecundación heteróloga y su posible correlación con las diversas pruebas empleadas en la contrastación “in vitro” de la viabilidad de las células espermáticas de macho cabrío.

4.1. EFECTO DE LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN DEL SEMEN CAPRINO SOBRE EL PERFIL DE CAPACITACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA.

Los resultados obtenidos sobre la influencia de la conservación en la fisiología espermática del semen caprino heterospérmico han sido divididos en tres apartados. El primer bloque de resultados muestra el comportamiento fisiológico “in vitro” de los espermatozoides de macho cabrío sin tratamiento previo (semen fresco). En una segunda sección se analiza el efecto ejercido por la refrigeración a +5°C durante 2 horas y 30 minutos sobre la viabilidad y capacitación espermática (semen refrigerado), teniendo en cuenta los diluyentes empleados (BesKOH y TFC) y la utilización o no de la centrifugación como método de lavado preliminar a su conservación. Por último, se revisan los efectos ejercidos por la congelación sobre la fisiología espermática, considerando al igual que en el caso anterior distintos diluyentes y metodologías (semen congelado).

4.1.1. CAPACITACIÓN DE SEMEN CAPRINO FRESCO

Los datos obtenidos sobre la capacitación "in vitro" del semen caprino fresco (F) se encuentran reflejados en la **Tabla 17**: porcentaje de espermatozoides móviles (EM), calidad de movimiento (CM), espermatozoides vivos (EV), acrosomas normales (NAR), permeabilidad de membrana (E+); y **Tabla 18**: espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VA), vivos con acrosoma reaccionado (VR), muertos con acrosoma intacto (MA) y muertos con acrosoma reaccionado (MR), mostrando en cada caso la media \pm error estandar y su coeficiente de variación.

Tabla 17.- Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles (EM), calidad de movimiento (CM), espermatozoides vivos (EV), normalidad acrosómica (NAR) y endósmosis positiva (E+) durante 24 horas de capacitación en semen caprino heterospérmico fresco. Se encuentra representado en todos los casos la media \pm error estandar, figurando entre paréntesis el coeficiente de variación (CV).

	TIEMPO					
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
EM	80.0 \pm 0.6 (5.0%)	79.8 \pm 0.4 (3.8%)	77.2 \pm 0.9 (4.0%)	77.5 \pm 0.8 (7.7%)	75.8 \pm 1.0 (9.2%)	66.8 \pm 1.8 (16.7%)
CM	4.6 \pm 0.06 (8.6%)	4.5 \pm 0.06 (11.1%)	3.9 \pm 0.08 (12.8%)	3.9 \pm 0.06 (10.2%)	3.8 \pm 0.05 (7.8%)	3.4 \pm 0.06 (11.7%)
EV	78.0 \pm 0.7 (6.6%)	78.6 \pm 1.0 (8.1%)	75.5 \pm 1.3 (11.9%)	77.0 \pm 1.0 (7.7%)	74.3 \pm 1.1 (10.2%)	65.6 \pm 1.2 (12.3%)
NAR	77.2 \pm 0.9 (8.4%)	75.3 \pm 0.9 (8.4%)	73.3 \pm 1.3 (12.9%)	75.5 \pm 0.9 (8.3%)	71.6 \pm 1.1 (10.2%)	64.4 \pm 1.3 (12.3%)
E+	30.2 \pm 1.0 (21.5%)	21.1 \pm 1.0 (31.2%)	17.1 \pm 1.0 (38.9%)	17.1 \pm 1.2 (48.5%)	15.3 \pm 0.8 (32.0%)	16.2 \pm 1.3 (53.0%)

Tamaño medio de la muestra, n= 47

Tabla 18.- Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VA), vivos con acrosoma reaccionado (VR), muertos con acrosoma intacto (MA) y muertos con acrosoma reaccionados (MR), determinados mediante la técnica de la triple tinción, durante 24 horas de capacitación en semen caprino heterospermico fresco. Se encuentra representado en todos los casos la media \pm error estandar, figurando entre paréntesis el coeficiente de variación (CV) para cada parámetro.

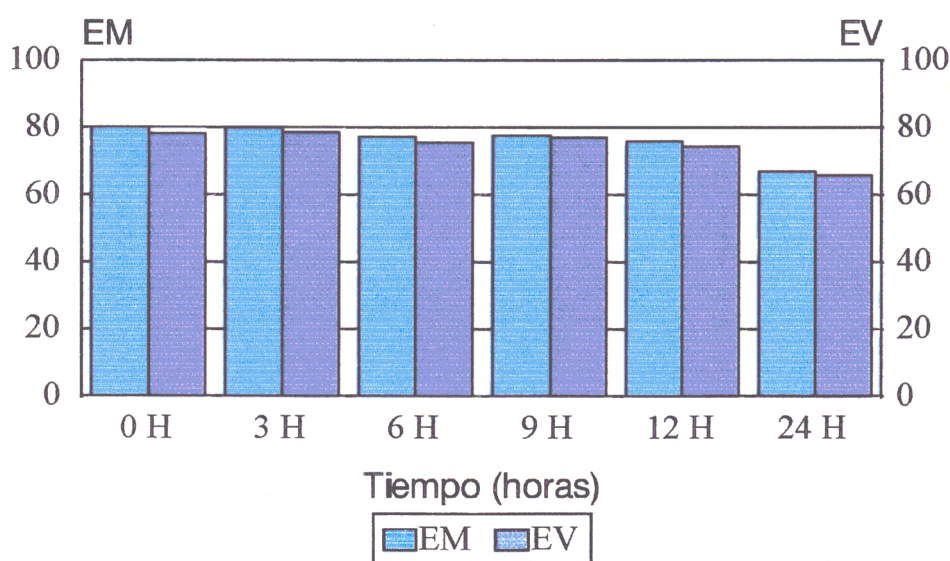
	TIEMPO					
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
VA	81.6 \pm 1.3 (11.6%)	77.9 \pm 1.3 (11.9%)	73.6 \pm 1.4 (12.9%)	72.1 \pm 1.4 (13.4%)	69.6 \pm 1.7 (17.5%)	57.4 \pm 1.4 (14.6%)
VR	2.7 \pm 0.3 (100%)	6.7 \pm 0.4 (43.2%)	11.5 \pm 1.0 (53.9%)	6.2 \pm 0.7 (79.0%)	2.8 \pm 0.3 (78.5%)	1.9 \pm 0.3 (100%)
MA	7.4 \pm 0.4 (37.8%)	7.3 \pm 0.5 (56.1%)	7.1 \pm 0.7 (47.8%)	8.1 \pm 0.5 (51.8%)	8.8 \pm 0.5 (42.0%)	11.0 \pm 0.5 (29.0%)
MR	7.7 \pm 0.7 (58.4%)	9.5 \pm 0.9 (65.2%)	10.3 \pm 1.1 (65.0%)	14.8 \pm 1.3 (57.4%)	18.4 \pm 1.2 (40.7%)	28.9 \pm 1.3 (26.9%)

Tamaño medio de la muestra, n= 47

4.1.1.1 Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles y vivos.

En el **Gráfico 1** se refleja la evolución del porcentaje de espermatozoides móviles (EM) y vivos (EV) a lo largo de toda la experiencia, mostrando un comportamiento paralelo (**Tabla 17**). No se observan variaciones significativas en ninguno de los dos parámetros hasta el final de la experiencia (12-24h: $p < 0.01$). El porcentaje de espermatozoides móviles es siempre superior, aunque no significativo, al de espermatozoides vivos, siendo esta diferencia debida al carácter subjetivo de la determinación de la población espermática móvil, menos exacta que el recuento de 100 espermatozoides y su posterior valoración microscópica.

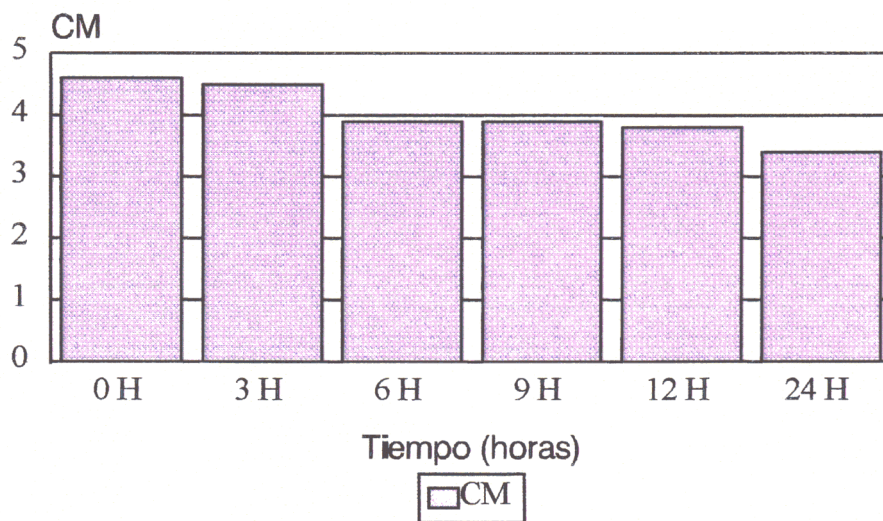
Grafico 1.- Porcentaje de espermatozoides móviles (EM) y vivos (EV) observados durante 24h de capacitación.



4.1.1.2. Evolución de la calidad de movimiento

En el **Gráfico 2** se muestra el tipo de movimiento desarrollado por las células espermáticas, observándose la aparición de dos mesetas (**Tabla 17**). La primera de ellas, definida entre las 0 y 3 horas, refleja un desplazamiento progresivo y muy rápido de los espermatozoides; mientras que en una segunda fase, 6-12 horas, se observa un descenso en la velocidad y una mayor amplitud en el batido del flagelo, apareciendo entre ambos periodos (3-6 horas) diferencias significativas de $p < 0.01$. A partir de 12 horas de capacitación se observa un deterioro en la movilidad espermática, siendo la calidad de movimiento observado al final del período de 3,4.

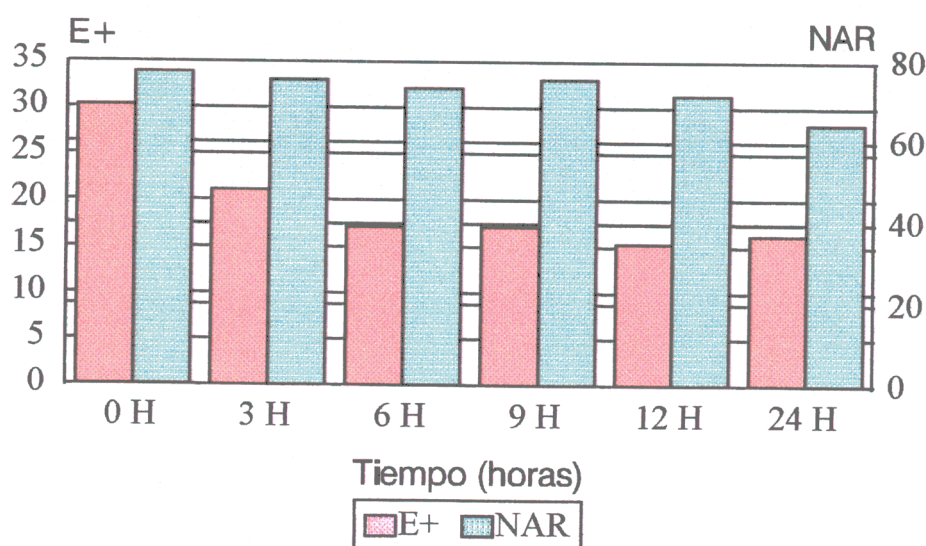
Grafico 2.- Calidad de movimiento desarrollado por los espermatozoides móviles (CM) observado durante 24h de capacitación.



4.1.1.3. Evolución del porcentaje de espermatozoides con normalidad acrosómica y endósmosis positiva

La proporción de espermatozoides que presentan acrosoma normal, detectado mediante microscopía de contraste de fases, disminuye de forma progresiva, a lo largo de toda la experiencia, siendo dicho descenso más acusado tras 12 horas de incubación ($p < 0.01$) (**Gráfico 3**) (**Tabla 17**). La proporción de células espermáticas que presentan endósmosis positiva decrece rápidamente durante las seis primeras horas de capacitación, pasando de 30,2% a las 0 horas a un 17,1% a las 6 horas. Transcurrido este período de tiempo se obtiene una meseta, representativa del bajo porcentaje de variación existente en la permeabilidad de la membrana plasmática durante el resto del estudio (**Tabla 17**).

Grafico 3.- Porcentaje de espermatozoides con endosmosis positiva (E+) y con acrosoma normal (NAR) observado durante 24h de capacitación.

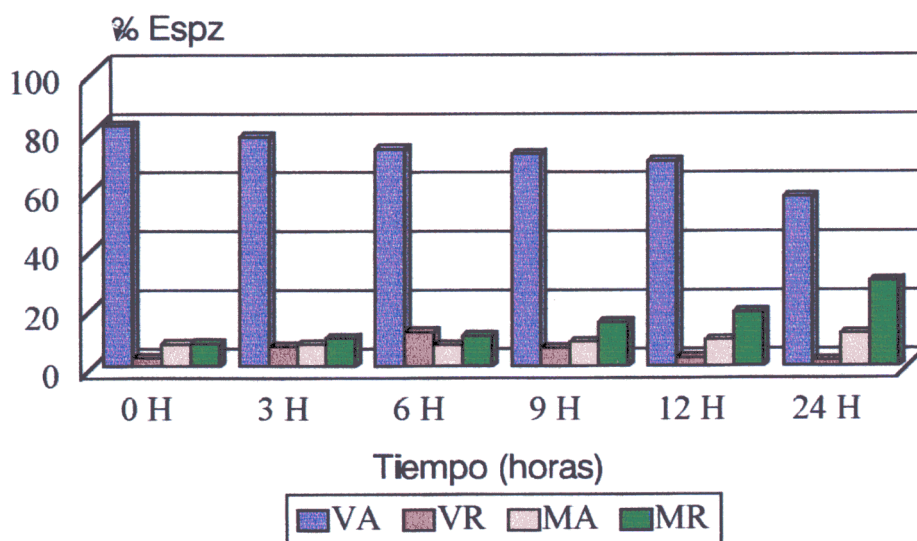


4.1.1.4. Evolución del porcentaje de vitalidad espermática y estatus acrosomal

La determinación de la viabilidad y del estado del acrosoma espermático en semen fresco de macho cabrío (**Gráfico 4**), se realizó mediante la utilización de la técnica de la triple tinción, la cual distingue entre cuatro categorías espermáticas: espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VA), vivos con acrosoma reaccionado (VR), muertos con acrosoma intacto (MA) y muertos con acrosoma reaccionados (MR) (**Tabla 18**) según el apartado 3.2.5.5. de Material y Métodos.

Se observa un descenso gradual del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma en las distintas muestras espermáticas analizadas y un incremento de la proporción de muertos con acrosoma reaccionado a lo largo de todo el estudio, siendo la evolución de ambas variables independiente. El tanto por ciento de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado presenta una curva cuyo máximo se encuentra situado a las 6 horas de capacitación (11,5%). Los espermatozoides muertos con acrosoma intacto se mantienen constantes durante las 6 primeras horas para experimentar a continuación un débil ascenso.

Gráfico 4.- Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VA), vivos con acrosoma reaccionado (VR), muertos con acrosoma intacto (MA) y muertos con acrosoma reaccionado (MR) observado durante 24h de capacitación



La evolución de los diferentes parámetros estudiados a lo largo del periodo de capacitación espermática se expresa en la **Tabla 19**. No se observan cambios significativos durante las primeras 12 horas en la práctica totalidad de las variables, indicando una evolución lenta pero progresiva de las mismas durante el periodo estudiado. El tipo de movimiento desarrollado por los espermatozoides móviles muestra diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las 3-6 h, coincidiendo con el máximo de células espermáticas vivas que presentan reacción acrosómica, y en el último periodo de incubación. Se detectan también diferencias significativas ($p < 0,01$) en la permeabilidad de la membrana plasmática en las tres primeras horas de capacitación, siendo indicativo de cambios producidos en la membrana espermática. Durante las 24 horas de capacitación, se observa un descenso en la proporción de espermatozoides vivos reaccionados no asociado al aumento en el número de espermatozoides muertos reaccionados, indicando la evolución desde la forma “vivo con acrosoma” a “vivo reaccionado” y finalmente “muerto reaccionado”. No se han encontrado diferencias significativas durante el estudio en la proporción de espermatozoides muertos con acrosoma.

Tabla 19.- Estimación de la variabilidad y nivel de significancia existente en los distintos parámetros observados en semen caprino fresco durante el periodo de capacitación ($F^{\text{nivel de significancia}}$).

	EM	CM	EV	NAR	E+	VA	VR	MA	MR
0-3 h	-	-	-	-	7.2**	-	5.4**	-	-
3-6 h	-	5.9**	-	-	-	-	7.1**	-	-
6-9 h	-	-	-	-	-	-	8.3**	-	-
9-12 h	-	-	-	-	-	-	3.9**	-	-
12-24 h	7.3**	3.6**	5.6**	3.7**	-	5.9**	-	-	6.4**

(-): No significativo; (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$

4.1.2. CAPACITACIÓN DE SEMEN CAPRINO REFRIGERADO

Tras la observación del comportamiento experimentado por los espermatozoides capacitados de macho cabrío a partir de semen fresco (sin ningún tratamiento previo), procedemos al análisis de los resultados obtenidos durante 24 horas de capacitación “in vitro” del semen caprino refrigerado durante 2 horas y 30 minutos mediante distintas técnicas de conservación espermática: BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC), estableciendo las posibles diferencias existentes entre las mismas.

4.1.2.1. Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles

El porcentaje de espermatozoides móviles observado tras la capacitación del semen caprino refrigerado (**Tabla 20**) experimenta un descenso progresivo y paralelo en las cuatro metodologías empleadas (**Gráfico 5**), sin que exista interacción entre el método de conservación seminal empleado y el tiempo de incubación. Se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) al inicio de la experiencia entre B (83.8%) y TC (78.8%). A las 3 horas de capacitación, se obtiene un mayor porcentaje de espermatozoides móviles ($p < 0.05$) en aquellas muestras que han sido previamente refrigerados en BesKOH (B y BC) que en TFC (T y TC).

No se observan diferencias significativas entre los medios: sin y con centrifugación, sin embargo, los valores medios obtenidos en BC y TC son siempre de orden inferior a los encontrados en B y T. Aproximadamente el 50% de la población espermática permanece móvil tras 24 horas de capacitación.

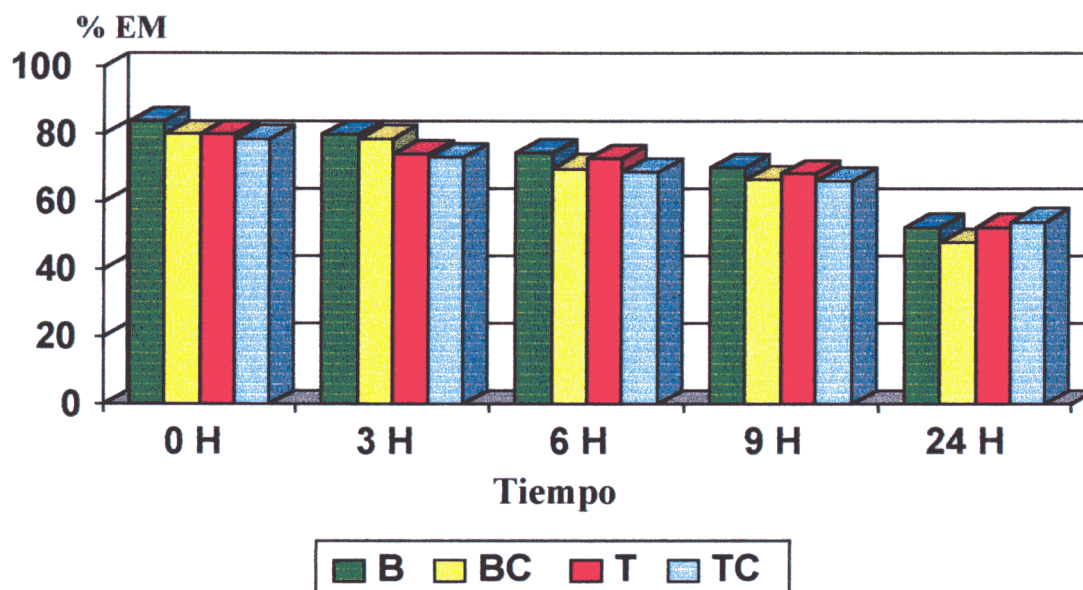
Tabla 20.- Porcentaje de espermatozoides móviles (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino tras la refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

EM	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	83.8 \pm 0.9 ^x (6.8%)	79.8 \pm 1.1 ^{a x} (8.8%)	74.7 \pm 1.1 ^a (9.1%)	70.2 \pm 1.4 (12.2%)	52.2 \pm 2.0 (23.7%)
BC	79.8 \pm 1.2 (9.5%)	78.8 \pm 1.0 ^y (8.5%)	70.0 \pm 1.6 (15%)	66.8 \pm 2.0 (16.9%)	48.0 \pm 2.5 (31.0%)
T	80.1 \pm 0.9 (7.1%)	74.2 \pm 1.4 ^a (11.8%)	72.8 \pm 1.3 (12.0%)	68.5 \pm 1.4 (11.9%)	52.6 \pm 1.8 (21.2%)
TC	78.7 \pm 1.0 ^x (8.0%)	73.5 \pm 1.1 ^{y x} (9.5%)	68.7 \pm 1.3 ^a (12.0%)	66.3 \pm 1.7 (15.0%)	54.0 \pm 1.8 (23.2%)

Superíndices iguales en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a, b} $p < 0,05$; ^{x, y} $p < 0,01$.

Tamaño medio de la muestra, n° = 37.

Gráfico 5.- Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles (EM) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospermico tras su refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC).



4.1.2.2. Evolución de la calidad de movimiento

El tipo de movimiento desarrollado por las células espermáticas manifiesta un comportamiento similar en las cuatro condiciones experimentales propuestas (Gráfico 6), existiendo diferencias significativas ($p < 0,01$) tan sólo al inicio de la capacitación (0 horas) entre B (4.7) y TC (4.4) (Tabla 21). Se observa un cambio en movilidad espermática como consecuencia de los cambios fisiológicos inducidos durante la capacitación, pasando de un movimiento rápido y rectilíneo al comienzo de la observación a otro de menor velocidad y trayectoria curvilínea al final de la misma.

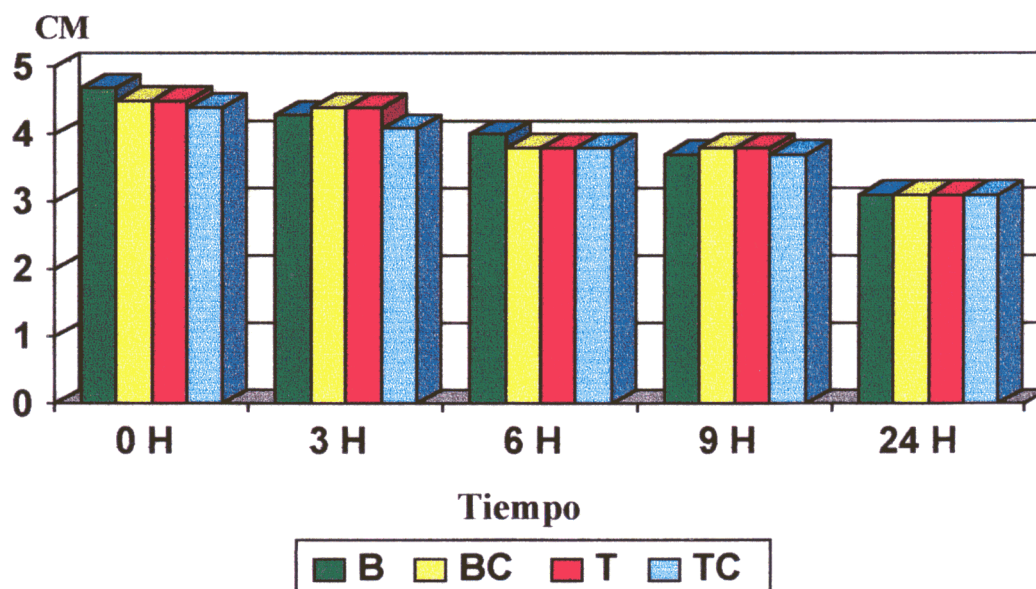
Tabla 21.- Calidad de movimiento (CM) (media \pm error estandar y coeficiente de variación), valorado de 0 a 5, obtenido durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino tras la refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

CM	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	4.7 \pm 0.05 ^x (6.3%)	4.3 \pm 0.06 (9.3%)	4.0 \pm 0.09 (15.0%)	3.7 \pm 0.06 (8.1%)	3.1 \pm 0.06 (12.9%)
BC	4.5 \pm 0.07 (8.8%)	4.4 \pm 0.07 (9.0%)	3.8 \pm 0.05 (7.8%)	3.8 \pm 0.08 (16.1%)	3.1 \pm 0.07 (10.5%)
T	4.5 \pm 0.07 (8.8%)	4.4 \pm 0.09 (12.1%)	3.8 \pm 0.05 (7.8%)	3.8 \pm 0.07 (10.8%)	3.1 \pm 0.06 (9.3%)
TC	4.4 \pm 0.06 ^x (9.0%)	4.1 \pm 0.06 (9.7%)	3.8 \pm 0.06 (10.5%)	3.7 \pm 0.05 (8.3%)	3.1 \pm 0.05 (9.6%)

Superíndices iguales en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a,b} $p < 0,05$; ^{x,y} $p < 0,01$

Tamaño medio de la muestra, $n = 37$.

Gráfico 6.- Calidad de movimiento espermático (CM) bservado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospérmico tras su refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC).



4.1.2.3. Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos

La proporción de espermatozoides vivos observada durante el estudio de capacitación “in vitro” en semen caprino refrigerado, mediante la técnica de naranja de acridina, se muestra en la **Tabla 22**. Se observa un comportamiento similar y paralelo en B, BC, T y TC (**Gráfico 7**), sin que exista interacción entre el método de refrigeración seminal empleado y el tiempo de incubación del mismo. Tan solo se estima una diferencia significativa puntual ($p < 0.05$) a las 3 horas del comienzo del estudio entre los diluyentes de refrigeración B (78.9%) y T (69.4%). Tras 24 horas de capacitación, aproximadamente un 60% de la población permanece viva.

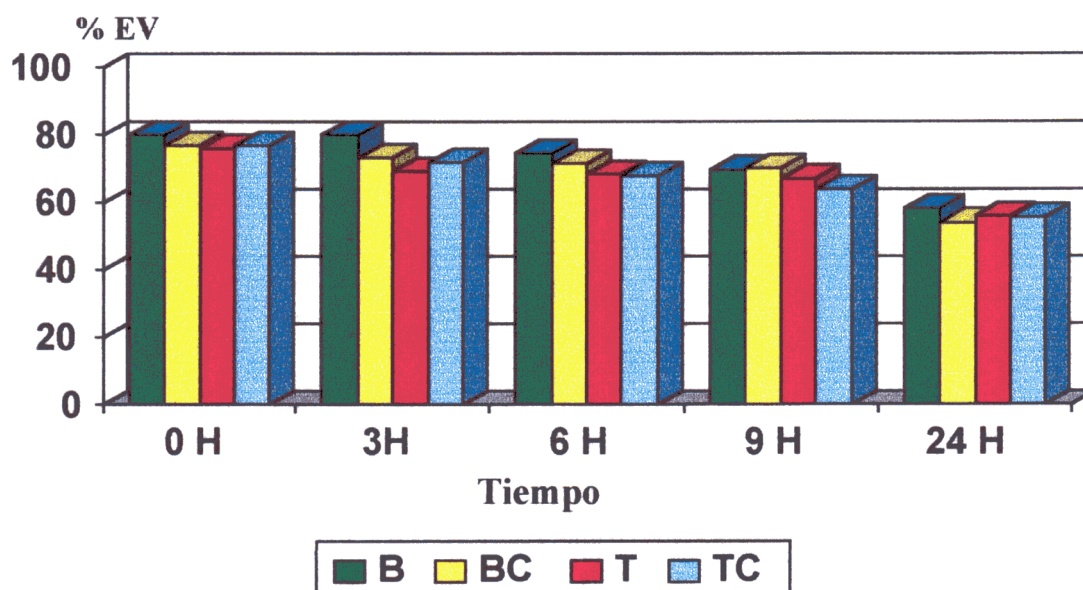
Tabla 22.- Porcentaje de espermatozoides vivos, determinado mediante naranja de acridina, (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino tras la refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

EV	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	80.2 \pm 0.9 (7.1%)	79.8 \pm 1.1 ^a (6.0%)	74.7 \pm 1.1 (12.6%)	69.8 \pm 1.4 (12.7%)	58.3 \pm 2.0 (17.8%)
BC	76.7 \pm 1.5 (11.8%)	73.2 \pm 1.2 (12.1%)	71.6 \pm 1.7 (16.6%)	70.1 \pm 1.6 (13.2%)	54.0 \pm 2.3 (25.3%)
T	76.1 \pm 1.1 (9.1%)	69.4 \pm 1.2 ^a (10.8%)	68.5 \pm 1.5 (10.3%)	66.9 \pm 1.7 (15.2%)	56.0 \pm 1.7 (15.8%)
TC	76.9 \pm 1.4 (10.5%)	71.8 \pm 1.3 (9.4%)	67.9 \pm 1.0 (14.9%)	63.8 \pm 1.9 (17.3%)	55.4 \pm 2.2 (25.5%)

Superíndices iguales en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a, b} $p < 0.05$; ^{x, y} $p < 0.01$

Tamaño medio de la muestra, $n = 37$

Gráfico 7.- Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos (EV) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospermico tras su refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



4.1.2.4. Evolución del porcentaje de espermatozoides con normalidad acrosómica

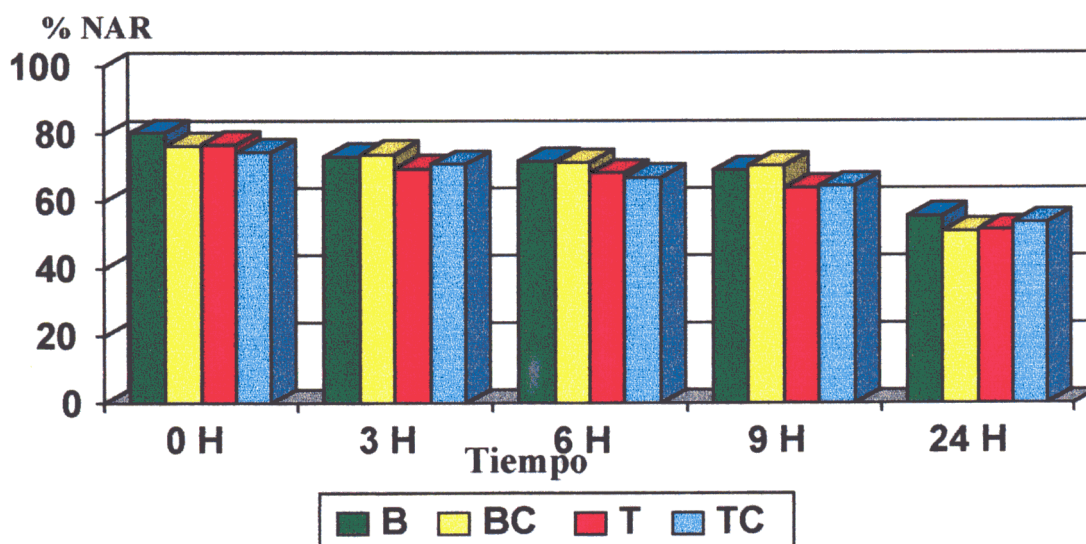
El porcentaje de espermatozoides que presentan acrosoma normal tras su valoración por microscopía de contraste de fases durante todo el período de capacitación se muestra en la **Tabla 23**. No se observan diferencias significativas entre las distintas metodologías empleadas, si bien, existe una menor pérdida de la integridad acrosómica al inicio de la experiencia (0 horas) en aquellas muestras seminales que no han sufrido un lavado previo a su refrigeración B (80.6%) y T (76.8%) frente a las que sí BC (76.6%) y TC (74.8). En el resto de los tiempos no se observa un patrón común entre los diferentes procedimientos utilizados. La representación gráfica de esta variable (**Gráfico 8**) muestra un descenso gradual en su proporción, siendo más acusada en el período comprendido entre las 9 y 24 horas.

Tabla 23- Porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino tras la refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

NAR	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	80.6 \pm 1.1 (8.9%)	73.2 \pm 1.6 (14.3%)	72.0 \pm 1.4 (12.0%)	69.2 \pm 1.5 (13.1%)	55.6 \pm 1.4 (15.2%)
BC	76.6 \pm 1.3 (10.2%)	74.0 \pm 1.2 (15.0%)	71.6 \pm 1.7 (14.2%)	70.8 \pm 1.1 (9.1%)	50.9 \pm 1.6 (18.0%)
T	76.8 \pm 1.6 (13.6%)	69.7 \pm 1.3 (11.7%)	68.5 \pm 1.5 (14.5%)	64.2 \pm 1.6 (14.7%)	51.7 \pm 1.9 (23.5%)
TC	74.8 \pm 1.4 (11.6%)	70.9 \pm 1.4 (12.6%)	67.3 \pm 1.6 (15.3%)	64.5 \pm 1.9 (26.0%)	53.9 \pm 1.9 (27.2%)

Tamaño medio de la muestra, n= 37.

Gráfico 8.- Evolución del porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (NAR) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospérmico tras su refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



4.1.2.5. Evolución del porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva

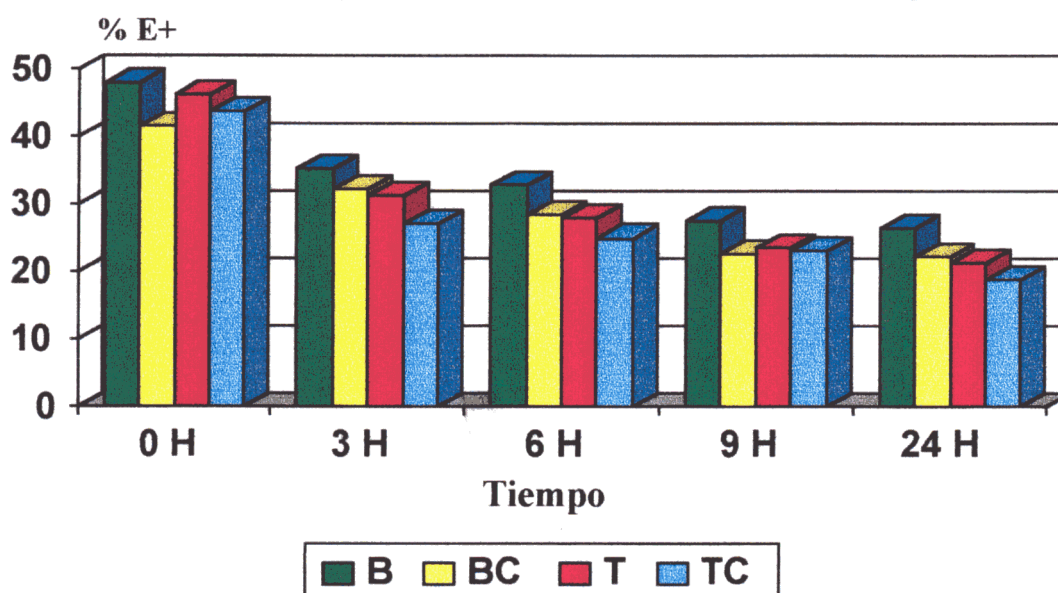
La permeabilidad de membrana, representado como el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (E+), obtenido de la capacitación espermática de diferentes técnicas de refrigeración se refleja en la **Tabla 24**. Los valores encontrados en las muestras centrifugadas, BC y TC (0 h: 41.6% y 43.8%), son inferiores, aunque no significativos, a los encontrados en B y T (0 h: 48.1% y 46.2%, respectivamente) durante las primeras horas de capacitación. Las muestras procedentes de alícuotas refrigeradas con BesKOH sin centrifugar obtienen los porcentajes más altos de endósmosis positiva a lo largo de todo el estudio, no observándose diferencias significativas frente al resto de las metodologías de conservación utilizadas. El descenso en el porcentaje de E+ es mas pronunciado durante las primeras 9 horas, siendo la pérdida de permeabilidad a partir de este momento menos pronunciada (**Gráfico 9**).

Tabla 24.- Porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (E+) (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino tras la refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

E+	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	48.1 \pm 1.8 (22.4%)	35.3 \pm 2.0 (34.8%)	32.9 \pm 2.3 (19.9%)	27.6 \pm 1.8 (39.4%)	26.5 \pm 2.0 (48.1%)
BC	41.6 \pm 1.8 (26.4%)	32.3 \pm 1.7 (34.0%)	28.4 \pm 1.8 (40.8%)	22.6 \pm 1.6 (41.5%)	22.2 \pm 1.8 (48.6%)
T	46.2 \pm 2.0 (25.3%)	31.4 \pm 1.9 (35.6%)	28.1 \pm 1.8 (41.2%)	23.6 \pm 1.6 (39.4%)	21.4 \pm 1.4 (40.6%)
TC	43.8 \pm 2.1 (28.5%)	27.2 \pm 1.8 (41.1%)	25.0 \pm 1.9 (49.6%)	23.1 \pm 1.7 (43.2%)	18.8 \pm 1.5 (47.3%)

Tamaño medio de la muestra, n= 37.

Gráfico 9.- Evolución del porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (E+) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospérmico tras su refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



4.1.2.6. Evolución de la vitalidad espermática y estatus acrosomal

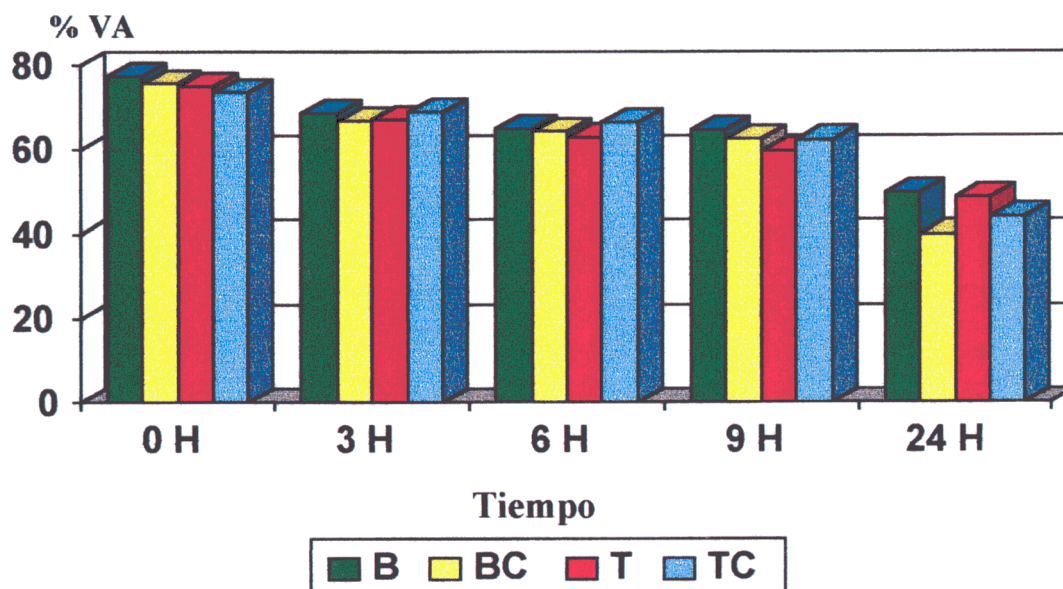
Los espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VA) determinados mediante la técnica de la triple tinción, experimentan un descenso a lo largo del período de capacitación (**Gráfico 10**). El declive observado en la proporción de dicho parámetro es más pronunciado trascurridas las primeras 9 horas de capacitación espermática, no observándose diferencias significativas entre las tecnologías de refrigeración aplicadas en ninguno de los tiempos de observación (**Tabla 25**), indicando, al igual que ocurre en otras muchas variables, la falta de interacción entre dichos métodos y el tiempo de incubación espermática.

Tabla 25.- Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma (VA) (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino tras la refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

VA	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	77.5 \pm 1.4 (11.7%)	68.5 \pm 1.5 (13.7%)	65.0 \pm 1.5 (15.0%)	64.6 \pm 2.0 (17.1%)	49.8 \pm 2.5 (29.7%)
BC	75.2 \pm 1.7 (13.8%)	66.8 \pm 1.9 (17.3%)	64.4 \pm 1.9 (17.0%)	62.6 \pm 1.5 (12.9%)	40.0 \pm 2.8 (38.7%)
T	74.9 \pm 1.7 (14.6%)	67.3 \pm 1.9 (17.2%)	63.0 \pm 1.6 (15.7%)	59.7 \pm 1.7 (16.4%)	48.7 \pm 2.0 (22.3%)
TC	73.5 \pm 1.7 (14.1%)	68.9 \pm 1.6 (13.9%)	66.5 \pm 1.5 (12.0%)	62.4 \pm 2.2 (18.4%)	44.1 \pm 2.6 (31.9%)

Tamaño medio de la muestra, n= 37.

Gráfico 10.- Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VA) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospérmico tras su refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



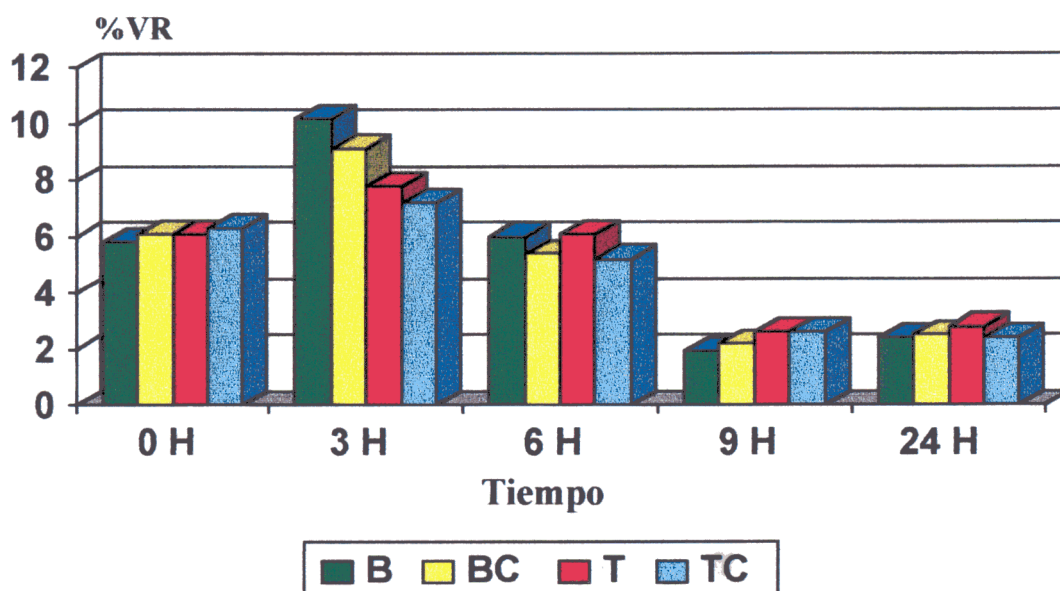
El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado obtenido a partir de muestras seminales de macho cabrío capacitado tras la refrigeración durante 2h y 30' a +5°C se muestran en la **Tabla 26**, encontrando variaciones no significativas entre las distintas metodologías empleadas. Los coeficientes de variación (CV) obtenidos a las 9 y 24 horas de observación en B, BC y TC son mayores en todos los casos al 100%, por lo que no se muestran en las celdas correspondientes. El valor tan alto que experimenta el CV es debido a la aparición de una población bimodal que presenta una desviación típica superior a la media. La curva obtenida a partir de la representación gráfica de los datos (**Gráfico 11**) posee el máximo a las 3 horas de comenzar el estudio, siendo superior en B y BC (10.2% y 9.1% respectivamente) que en T y TC (7.8% y 7.2%) observando un aumento en los medios sin centrifugar frente a los centrifugados.

Tabla 26.- Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionados (VR) (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino tras la refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

VR	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	5.8 \pm 0.5 (53.4%)	10.2 \pm 0.8 (50.5%)	6.0 \pm 0.5 (60.0%)	1.9 \pm 0.4 (%)	2.4 \pm 0.4 (%)
BC	6.1 \pm 0.5 (50.8%)	9.1 \pm 0.8 (53.8%)	5.4 \pm 0.6 (68.5%)	2.2 \pm 0.4 (%)	2.5 \pm 0.4 (%)
T	6.1 \pm 0.7 (77.0%)	7.8 \pm 0.6 (48.7%)	6.1 \pm 0.6 (62.2%)	2.6 \pm 0.4 (92.3%)	2.8 \pm 0.4 (85.7%)
TC	6.3 \pm 0.7 (68.2%)	7.2 \pm 0.7 (58.3%)	5.2 \pm 0.8 (82.6%)	2.6 \pm 0.7 (%)	2.4 \pm 0.4 (%)

Tamaño medio de la muestra, n= 37.

Gráfico 11.- Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado (VR) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospérmico tras su refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



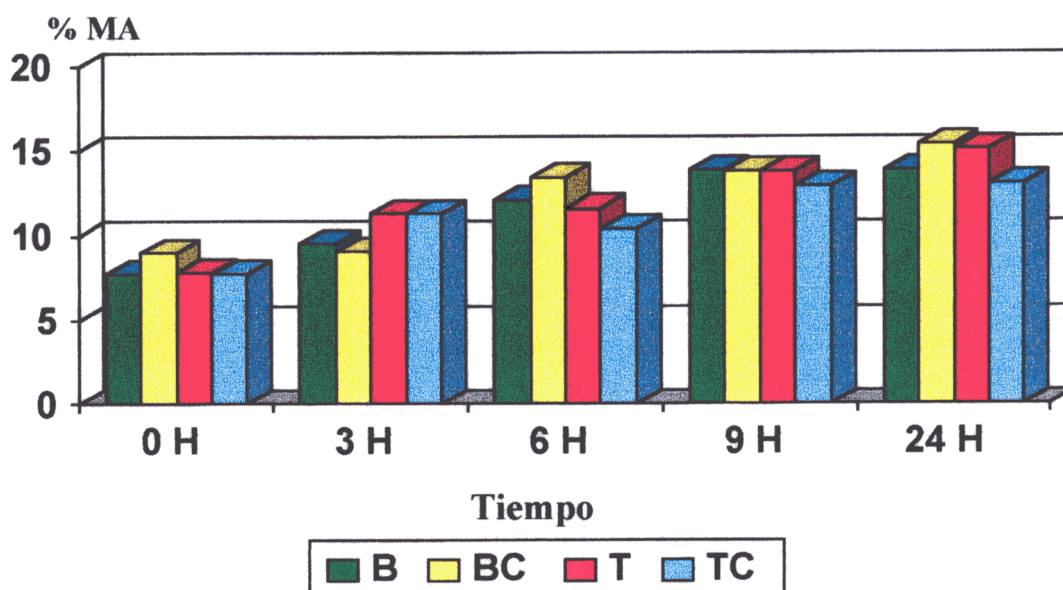
La proporción de células espermáticas muertas que presentan acrosoma intacto muestran una evolución ascendente lenta a lo largo del estudio (**Gráfico 12**), duplicando su valor inicial al final de la capacitación. No se observan diferencias significativas entre las cuatro técnicas empleadas (**Tabla 27**), si bien es la capacitación de las muestras refrigeradas en BesKOH con centrifugación las que presentan los mayores porcentajes de MA.

Tabla 27.- Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto (MA) (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino tras la refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

MA	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	7.7 \pm 0.7 (57.1%)	9.5 \pm 0.7 (50.5%)	12.1 \pm 0.9 (48.7%)	13.9 \pm 0.6 (27.3%)	13.9 \pm 0.8 (35.9%)
BC	9.0 \pm 0.8 (53.3%)	9.1 \pm 0.1 (54.4%)	13.4 \pm 1.3 (55.9%)	13.8 \pm 1.1 (44.2%)	15.4 \pm 1.2 (43.5%)
T	7.8 \pm 0.6 (48.7%)	11.3 \pm 0.7 (41.5%)	11.6 \pm 0.7 (42.2%)	13.8 \pm 0.9 (36.9%)	15.1 \pm 1.0 (41.7%)
TC	7.7 \pm 1.6 (51.9%)	11.3 \pm 1.6 (%)	10.4 \pm 1.0 (55.7%)	12.9 \pm 0.8 (31.7%)	13.1 \pm 0.8 (35.9%)

Tamaño medio de la muestra, n= 37.

Gráfico 12.- Evolución del porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto (MA) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospermico tras su refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



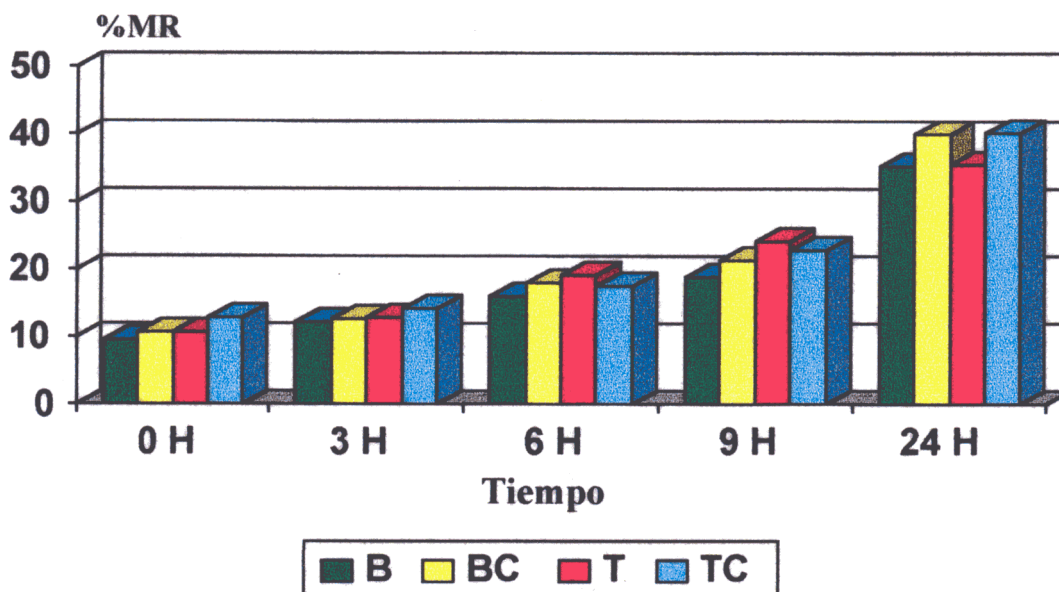
La proporción de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado muestra una tendencia claramente ascendente desde el comienzo de la experiencia, 0 h: B (9.5%) BC (9.9%), T (11.2%) y TC (12.9%) hasta la última observación, 24 h: B (35.4%), BC (40.1%), T (35.6%) y TC (39.3%) (**Gráfico 13**). Los valores obtenidos en las muestras seminales sin centrifugar son inferiores, aunque no significativos, a los procedentes de las centrifugadas, indicando una acción negativa (daño mecánico) de la centrifugación sobre la membrna plasmática de los espermatozoides (**Tabla 28**).

Tabla 28.- Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado (MR) (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino tras la refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

MR	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	9.5 \pm 1.2 (74.7%)	12.2 \pm 1.1 (56.5%)	16.0 \pm 1.4 (56.8%)	18.9 \pm 1.7 (52.9%)	35.4 \pm 2.1 (51.6%)
BC	10.6 \pm 1.5 (86.7%)	12.7 \pm 1.3 (60.6%)	18.0 \pm 1.5 (49.4%)	21.4 \pm 1.5 (36.9%)	40.0 \pm 2.8 (34.2%)
T	10.7 \pm 1.3 (74.7%)	12.8 \pm 1.5 (70.3%)	19.1 \pm 1.4 (47.1%)	24.2 \pm 1.5 (36.7%)	35.6 \pm 2.1 (33.6%)
TC	12.9 \pm 1.3 (62.7%)	14.3 \pm 1.2 (54.5%)	17.5 \pm 1.2 (39.4%)	22.9 \pm 2.0 (46.7%)	40.3 \pm 2.1 (41.6%)

Tamaño medio de la muestra, n= 37.

Gráfico 13.- Evolución del porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado (MR) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospérmico tras su refrigeración durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



Del estudio de los resultados encontrados en las distintas metodologías de refrigeración empleadas en semen caprino, debemos resaltar la igualdad observada en prácticamente todos los parámetros analizados, existiendo solo diferencias puntuales entre alguna de las técnicas utilizadas para un parámetro determinado.

4.1.2.7. Influencia de la refrigeración espermática sobre el perfil de capacitación de semen caprino.

Tras este primer análisis, se procede a la determinación de las diferencias existentes en la capacitación espermática de los diferentes métodos: B, BC, T y TC frente al semen fresco (**Tabla 29**). El porcentaje de endósmosis positiva observado a lo largo de la capacitación es mayor en las alícuotas refrigeradas que en el fresco, mientras que en el resto de las variables se mantiene una superioridad del semen que no ha sufrido tratamiento previo de conservación frente al que si lo han experimentado.

Tabla 29.- Estimación de la variabilidad existente en los distintos parámetros estudiados, mediante comparación de medias, entre el semen caprino fresco (F) y el refrigerado (para distintos medios y técnicas utilizadas) a lo largo del período de capacitación.

	0 H				3 H				6 H				9 H				24 H			
	F-B	F-BC	F-T	F-TC	F-B	F-BC	F-T	F-TC	F-B	F-BC	F-T	F-TC	F-B	F-BC	F-T	F-TC	F-B	F-BC	F-T	F-TC
EM	-3.4***	-	-	-	-	-	3.7***	5.1***	-	2.2***	2.6*	1.6***	4.2***	4.7***	5.4***	5.8***	2.7***	5.9***	2.6***	2.6***
CM	-	-	-	2.7°	-	-	3.1**	3.9***	-	-	1.7°	1.8°	1.8°	-	2.3*	3.3**	2.5*	2.5*	2.1*	2.9**
EV	1.8°	-	-	-	-	3.6***	5.9***	4.7***	-	3.1**	2.3*	3.9***	3.8***	3.5***	4.9***	6.0***	3.5***	4.4***	5.1***	4.1***
NAR	-2.3*	-	-	-	-	-	3.5***	2.5*	-	-	2.4*	3.0**	3.4**	3.2**	2.2***	2.7***	4.4***	6.3***	2.0**	4.5**
E+	-8.4***	-5.3***	-7.0***	-5.7***	-6.3***	-5.4***	-4.7***	-2.8**	-6.1***	-5.3***	-5.2***	-3.5***	-4.6***	-2.7**	-3.2**	-2.9**	-5.1***	-3.5***	-3.8***	-2.3*
VA	2.0*	2.9**	3.0**	3.7***	4.5***	4.7***	4.5	4.2***	4.0***	3.8***	4.9***	3.3***	3.1**	4.3***	5.5***	3.8***	2.5*	5.3***	3.3***	4.4***
VR	-4.9***	5.4***	-4.0***	-4.4***	-3.6*	-2.5*	-	-	4.6***	5.0***	4.5***	4.9***	4.9***	4.4***	4.0***	3.1**	-	-	-1.8°	-
MA	-	-1.7°	-	-	-2.2*	-3.8***	-4.1***	-2.2*	-5***	-4.9***	-5.4***	-3.2**	-6.2***	-4.2***	-5.3***	-4.6***	-2.8**	-3.3**	-3.3**	-2.1*
MR	-	-1.7°	-1.9°	-3.2**	-1.8°	-2.0*	-1.8°	-3.0**	-3.0**	-3.9***	-4.6***	-4.0***	-1.8°	-3.1**	-4.5***	-3.4**	-1.9°	-3.8***	-2.6*	-3.3**

(-) No significativo; (°) $p < 0.1$; (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$

Debido a las escasas diferencias significativas encontradas entre los distintos métodos de refrigeración previos al proceso de capacitación, se consideraron todos ellos como un sólo tratamiento, realizando a continuación un estudio del comportamiento experimentado por el semen capacitado a lo largo del tiempo en las diferentes variables estudiadas (**Tabla 30**) mediante análisis de varianza. Se observa una evolución significativa ($p < 0.001$) en todos los parámetros a lo largo de la capacitación en prácticamente todos los tiempos de estudio.

Tabla 30.- Estimación de la variabilidad y nivel de significancia existente en los distintos parámetros observados en semen caprino refrigerado durante el período de capacitación ($F^{\text{nivel de significancia}}$).

	EM	CM	EV	NAR	E+	VA	VR	MA	MR
0-3 h	3.2**	8.7**	3.9**	5.2**	23.5**	7.6**	8.2**	4.8**	-
3-6 h	5.2**	14.8**	1.5**	-	1.3**	1.4**	10.5**	-	1.4**
6-9 h	3.7**	2.5**	1.9**	2.0**	2.6**	-	13.8**	1.3**	3.0**
9-24 h	43.6**	27.5**	23.6**	33.9**	-	31.4**	-	-	9.5**

(-) No significativo; (**): $p < 0.01$

4.1.3. CAPACITACIÓN DE SEMEN DESCONGELADO

Los resultados obtenidos de la capacitación espermática a partir de semen caprino descongelado se muestran a continuación, observando los cambios experimentados en las distintas variables a lo largo de todo el estudio en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

4.1.3.1. Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles

La evolución del porcentaje de espermatozoides móviles observado durante 24 horas de capacitación obtenidos tras la descongelación de las diferentes alícuotas se muestra en la **Tabla 31**. Los valores más altos aparecen al principio de la experiencia, existiendo un descenso rápido y pronunciado a lo largo del período de capacitación. Se observa una diferencia significativa puntual ($p < 0.05$) entre el B (66.4%) y TC (59.1%) a las 0 horas, mostrando a partir de este momento un comportamiento paralelo entre todos los diluyentes de congelación tras la capacitación de las distintas muestras seminales (**Gráfico 14**).

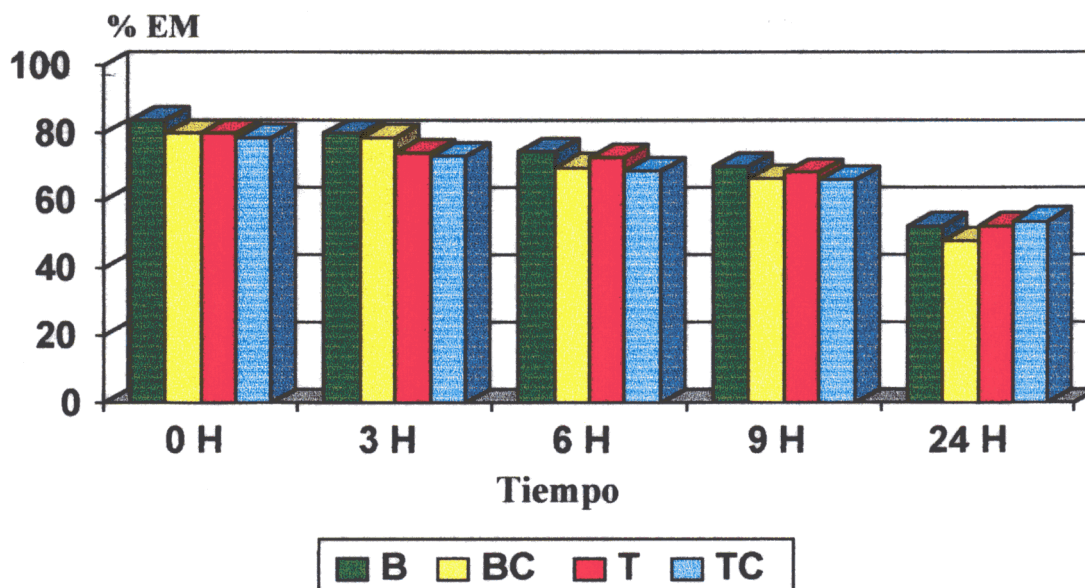
Tabla 31.- Porcentaje de espermatozoides móviles (EM) (media \pm error estándar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino descongelado en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

EM	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	66.4 \pm 1.6 ^a (15.0%)	44.5 \pm 1.9 (29.0%)	25.0 \pm 2.8 (63.6%)	12.2 \pm 1.6 (73.7%)	1.2 \pm 0.4 (%)
BC	62.2 \pm 1.6 (15.9%)	43.2 \pm 1.7 (22.9%)	21.3 \pm 2.4 (66.1%)	12.2 \pm 1.8 (82.7%)	1.4 \pm 0.4 (%)
T	62.9 \pm 1.7 (16.6%)	37.4 \pm 2.4 (37.9%)	20.4 \pm 1.8 (53.9%)	11.3 \pm 1.7 (92.9%)	1.6 \pm 0.7 (%)
TC	59.1 \pm 2.0 ^a (20.9%)	40.7 \pm 2.8 (39.5%)	20.1 \pm 2.1 (58.7%)	13.8 \pm 2.1 (86.9%)	2.8 \pm 1.2 (%)

Superíndices iguales en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a,b} $p < 0,05$; ^{x,y} $p < 0,01$

Tamaño medio de la muestra, $n = 35$

Gráfico 14.- Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles (EM) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospermico tras su descongelación durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



4.1.3.2. Evolución de la calidad de movimiento

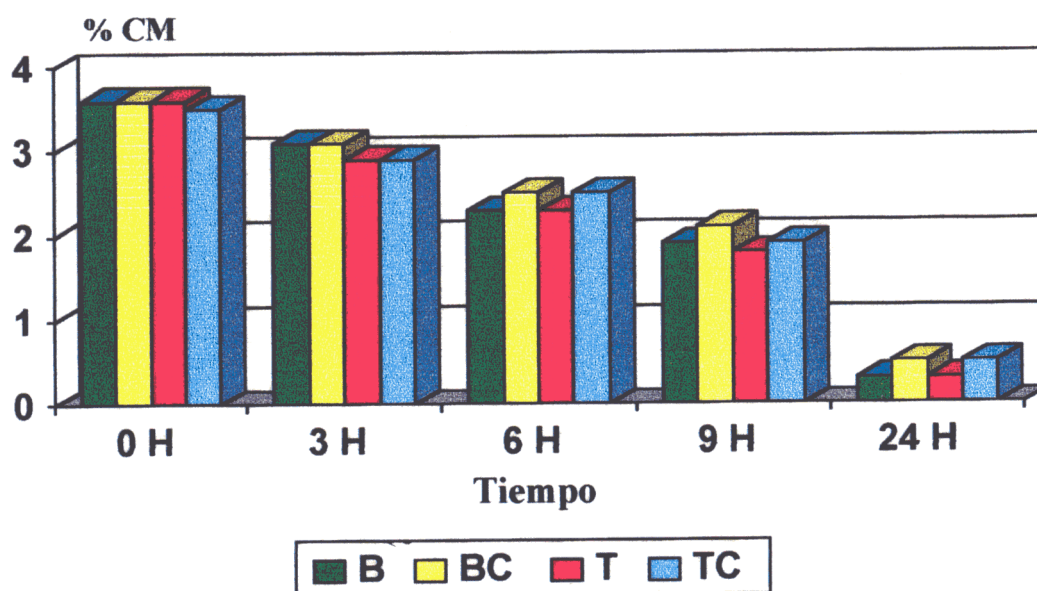
En la **Tabla 32** se ve reflejado el tipo de movimiento desarrollado por las células espermáticas móviles durante la capacitación a partir de semen descongelado. No se observan diferencias significativas a lo largo de toda la experiencia entre los distintos medios de congelación utilizados, siendo los valores encontrados muy similares entre sí (**Gráfico 15**). Durante las primeras 3 horas de capacitación los espermatozoides muestran movimientos de trayectoria rectilínea y de velocidad media, experimentando a partir de este momento un cambio en el patrón cinético. A partir de las 9 horas se observan movimientos espermáticos pasivos sin desplazamiento alguno.

Tabla 32.- Calidad de movimiento (CM) desarrollado por los espermatozoides móviles (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino descongelado en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

CM	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	3.6 \pm 0.07 (11.1%)	3.1 \pm 0.07 (12.9%)	2.3 \pm 0.1 (43.4%)	1.9 \pm 0.1 (52.6%)	0.3 \pm 0.1 (%)
BC	3.6 \pm 0.08 (13.8%)	3.1 \pm 0.06 (9.6%)	2.5 \pm 0.1 (24.0%)	2.1 \pm 0.1 (38.0%)	0.5 \pm 0.1 (%)
T	3.6 \pm 0.09 (13.8%)	2.9 \pm 0.07 (13.7%)	2.3 \pm 0.1 (30.4%)	1.8 \pm 0.1 (50.0%)	0.3 \pm 0.1 (%)
TC	3.5 \pm 0.1 (17.1%)	2.9 \pm 0.07 (13.7%)	2.5 \pm 0.09 (20.0%)	1.9 \pm 0.1 (47.3%)	0.5 \pm 0.1 (%)

Tamaño medio de la muestra, n= 35.

Gráfico 15.- Evolución de la calidad de movimiento (CM) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospermico tras su descongelación durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



4.1.3.3. Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos

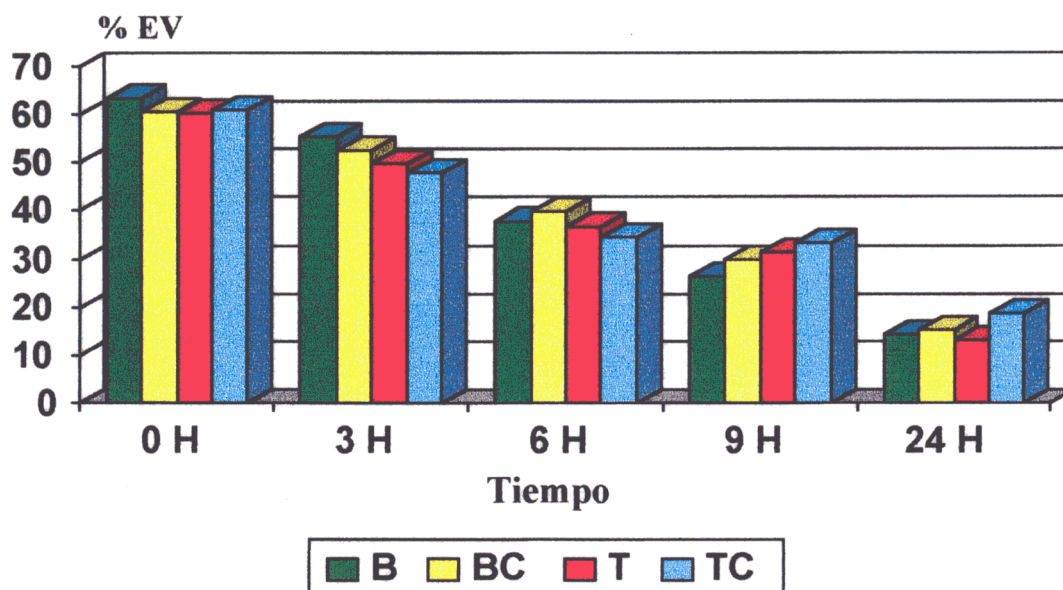
El porcentaje de espermatozoides vivos, determinado mediante fluorescencia, muestra una evolución paralela al observado en las células móviles, encontrando su máximo al principio de la capacitación y descendiendo progresivamente a lo largo de la misma (**Gráfico 16**). No se observa influencia de los diferentes diluyentes y métodos de congelación sobre la viabilidad en los espermatozoides capacitados durante el período de estudio (**Tabla 33**).

Tabla 33.- Porcentaje de espermatozoides vivos (EV) (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino descongelado en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

EV	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	63.4 \pm 1.6 (18.7%)	55.5 \pm 2.0 (23.6%)	37.8 \pm 2.2 (32.5%)	26.4 \pm 1.8 (43.4%)	14.4 \pm 1.4 (51.3%)
BC	60.8 \pm 1.5 (15.4%)	52.6 \pm 2.0 (20.3%)	39.9 \pm 2.0 (30.0%)	30.0 \pm 1.7 (35.0%)	15.1 \pm 1.3 (42.3%)
T	60.5 \pm 1.6 (15.5%)	49.7 \pm 2.0 (23.3%)	36.6 \pm 1.6 (26.7%)	31.4 \pm 2.1 (40.7%)	13.1 \pm 1.0 (38.1%)
TC	61.0 \pm 2.0 (20.9%)	47.8 \pm 2.0 (23.8%)	34.6 \pm 2.2 (34.3%)	33.4 \pm 1.6 (28.4%)	18.8 \pm 1.7 (45.2%)

Tamaño medio de la muestra, n= 35.

Gráfico 16.- Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos (EV) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospermico tras su descongelación durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



4.1.3.4. Evolución del porcentaje de espermatozoides con normalidad acrosómica

La pérdida del acrosoma, observado por microscopía de contraste de fases, durante 24 horas de capacitación se muestra en la **Tabla 34**. Se muestran valores superiores de NAR tras la capacitación de medios de congelación no centrifugados frente a los que sí, con diferencias significativas ($p < 0.05$) a las 9 horas entre B (33.2%) y TC (25.7%). Los valores encontrados durante las primeras 9 horas de estudio en BesKOH son superiores, aunque no significativos, a los de TFC. Se produce una pérdida del complejo acrosómico aproximado del 10% entre los distintos tiempos de observación (**Gráfico 17**).

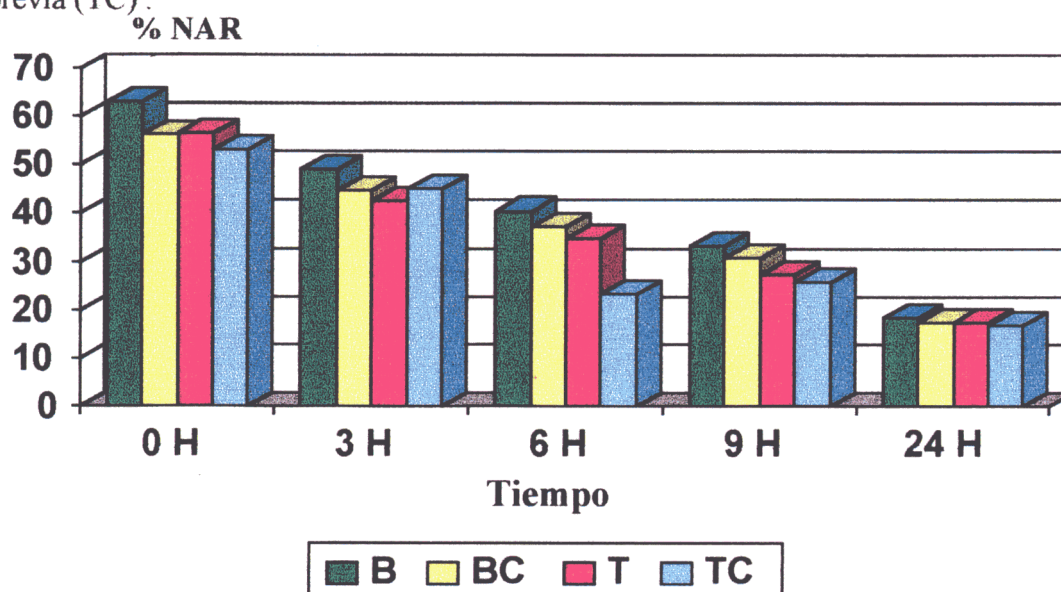
Tabla 34.- Porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (NAR) (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino descongelado en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

NAR	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	63.1 \pm 1.9 (23.6%)	49.2 \pm 2.6 (32.1%)	40.6 \pm 2.5 (36.9%)	33.2 \pm 1.7 ^a (28.0%)	18.5 \pm 1.6 (46.4%)
BC	56.3 \pm 1.5 (16.6%)	44.7 \pm 1.9 (23.4%)	37.2 \pm 1.4 (21.5%)	30.8 \pm 1.7 (29.8%)	17.5 \pm 1.7 (47.4%)
T	56.7 \pm 1.9 (20.6%)	42.7 \pm 1.9 (27.6%)	34.7 \pm 2.0 (34.5%)	27.4 \pm 1.8 (36.1%)	17.3 \pm 1.9 (54.3%)
TC	53.1 \pm 2.0 (23.3%)	45.0 \pm 2.4 (29.3%)	32.3 \pm 2.1 (34.3%)	25.7 \pm 1.6 ^a (36.1%)	16.9 \pm 1.6 (49.7%)

Superíndices iguales en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a, b} $p < 0.05$

Tamaño medio de la muestra, $n = 35$.

Gráfico 17.- Evolución del porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (NAR) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospermico tras su descongelación durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC).



4.1.3.5. Evolución del porcentaje de espermatozoides con endósmosis

La permeabilidad de membrana espermática obtenida a partir de las diferentes muestras descongeladas y posteriormente capacitadas se muestran en la **Tabla 35**. Se observa una mayor protección de la membrana plasmática con la utilización del diluyente B, siendo el TC el que presenta los valores más bajos a lo largo de la capacitación. Los valores encontrados en las alícuotas procedentes de muestras congeladas sin centrifugación previa son superiores a los que han sufrido dicho lavado. En el **Gráfico 18** se representan los datos obtenidos mediante el test de endósmosis positiva.

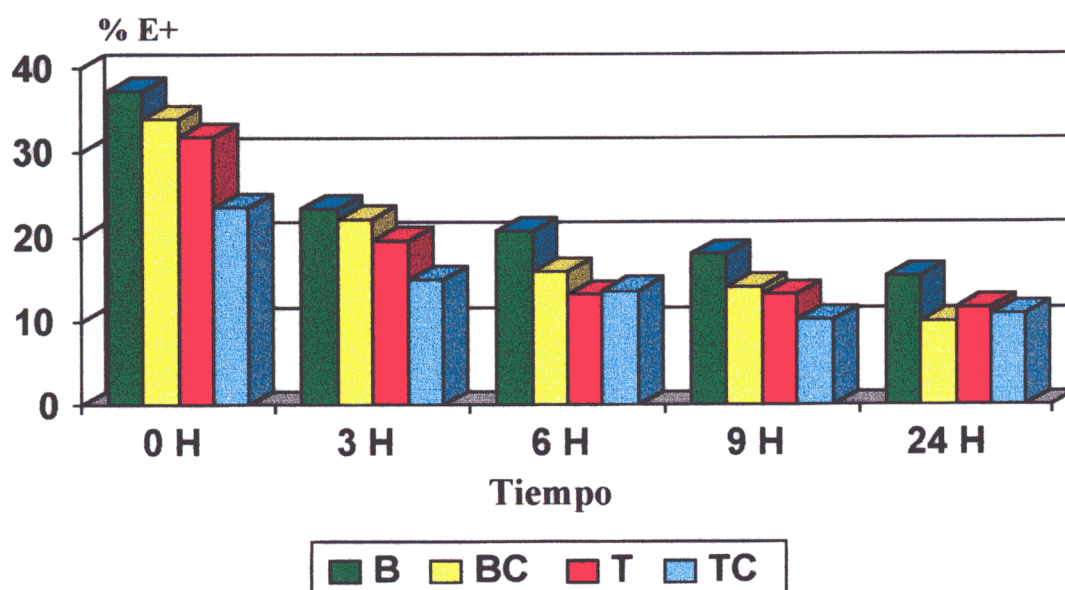
Tabla 35.- Porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (E+) (media \pm error estándar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino descongelado en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

E+	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	37.3 \pm 1.7 ^x (30.0%)	23.3 \pm 1.6 ^x (41.2%)	20.7 \pm 1.5 ^{xy} (39.6%)	18.0 \pm 1.3 ^x (41.6%)	15.3 \pm 1.4 ^a (50.3%)
BC	34.0 \pm 2.1 ^y (39.1%)	22.0 \pm 1.9 ^a (49.0%)	15.8 \pm 1.4 (49.3%)	14.0 \pm 1.3 (49.2%)	10.0 \pm 0.9 ^a (44.0%)
T	31.9 \pm 2.1 ^a (39.4%)	19.5 \pm 1.2 (37.4%)	13.2 \pm 1.0 ^x (46.5%)	13.2 \pm 1.0 (43.1%)	11.5 \pm 1.2 (53.0%)
TC	23.5 \pm 1.8 ^{xya} (47.2%)	14.9 \pm 1.0 ^{xa} (38.9%)	13.6 \pm 1.3 ^y (54.8%)	10.1 \pm 1.1 ^x (63.3%)	10.8 \pm 1.1 (54.6%)

Superíndices iguales en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a,b} $p < 0,05$; ^{x,y} $p < 0,01$

Tamaño medio de la muestra, $n = 35$.

Gráfico 18.- Evolución del porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (E+) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospérmico tras su descongelación durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC).



4.1.3.6. Evolución de la vitalidad espermática y estatus acrosomal

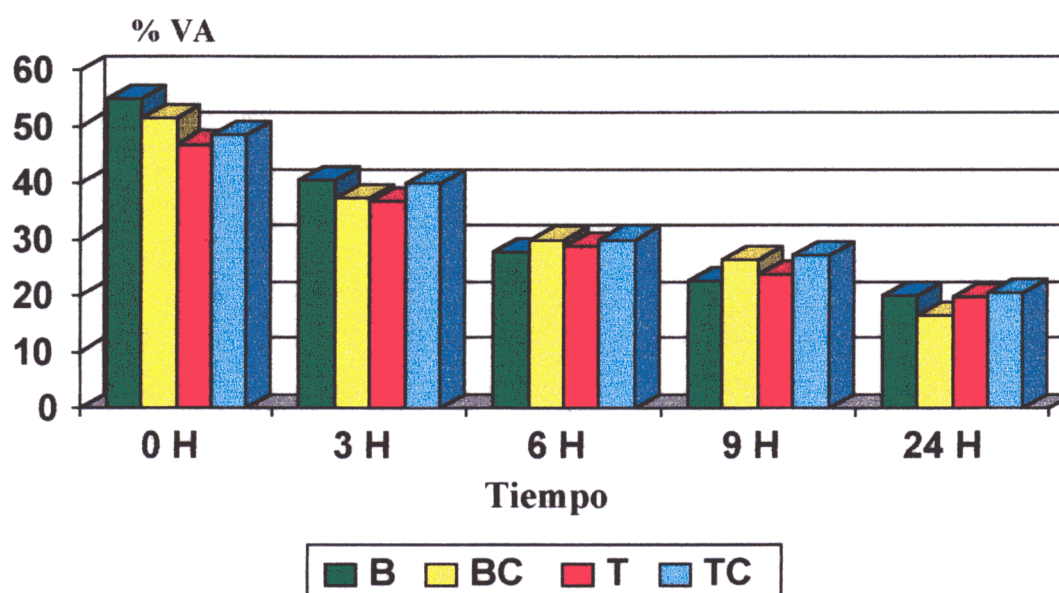
El estudio de la viabilidad y estado del acrosoma determinado mediante la utilización de la triple tinción, nos lleva a la clasificación de los espermatozoides en las cuatro categorías anteriormente mencionadas. Las células espermáticas vivas y con acrosoma intacto (**Tabla 36**) experimentan un descenso más pronunciado en las primeras 6 horas, siendo mucho más suave a partir de este momento (**Gráfico 19**). No se observan diferencias significativas entre los distintos métodos utilizados.

Tabla 36.- Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VA) (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino descongelado en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

VA	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	54.9 \pm 3.0 (30.4%)	40.6 \pm 1.6 (23.3%)	27.8 \pm 1.8 (51.0%)	22.6 \pm 1.5 (49.6%)	20.0 \pm 2.0 (50.0%)
BC	51.4 \pm 1.7 (18.0%)	37.3 \pm 2.0 (27.6%)	29.9 \pm 1.4 (24.7%)	26.3 \pm 1.6 (31.5%)	16.6 \pm 1.6 (48.7%)
T	46.8 \pm 1.7 (20.7%)	36.9 \pm 1.9 (29.2%)	28.8 \pm 1.3 (25.6%)	23.8 \pm 1.5 (34.0%)	19.8 \pm 1.9 (42.9%)
TC	48.6 \pm 2.1 (23.2%)	40.1 \pm 1.8 (24.1%)	30.0 \pm 2.2 (36.0%)	27.2 \pm 1.8 (34.1%)	20.5 \pm 1.6 (38.5%)

Tamaño medio de la muestra, n= 35.

Gráfico 19.- Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VA) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospérmico tras su descongelación durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC).



La evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado se presentan en la **Tabla 37**. El máximo en todos los casos analizados se observa a las 0 horas, experimentando un descenso gradual a partir de este momento (**Gráfico 20**). A las 3 horas del estudio se estiman diferencias significativas ($p < 0.05$) entre B (8.6%) y T (6.3%). Los valores encontrados a las 0 horas en las alícuotas procedentes de pajuelas descongeladas con TFC (T: 12,4% y TC: 12,3%) son superiores a los obtenidos con BesKOH (B: 9,5% y BC: 10,5%). En las siguientes 9 horas se muestra un mayor porcentaje de espermatozoides VR en B y TC frente al resto.

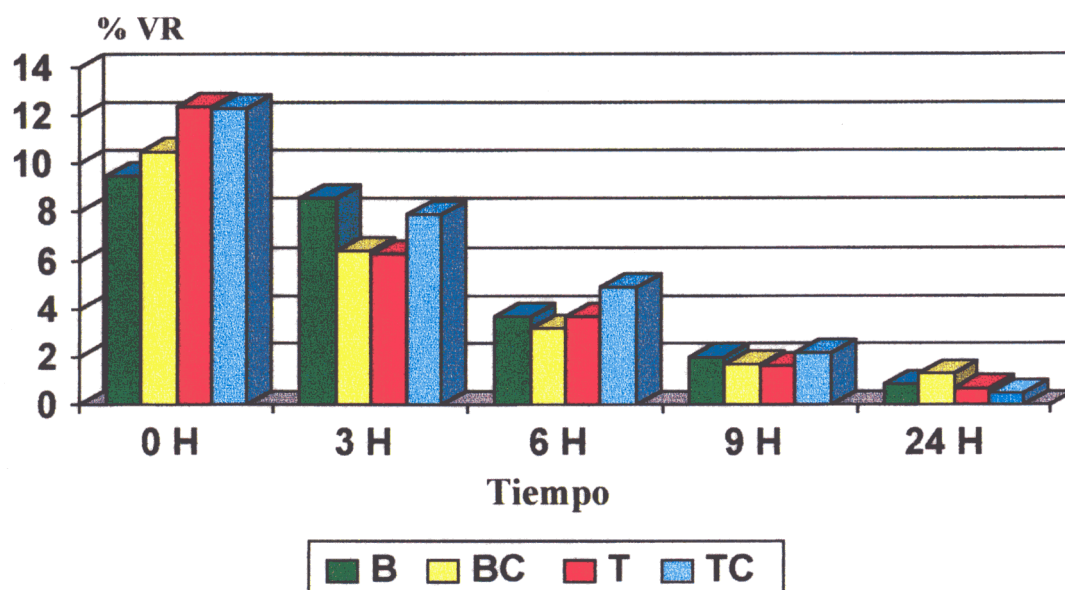
Tabla 37.- Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado (VR) (media \pm error estándar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino descongelado en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

VR	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	9.5 \pm 1.0 (58.9%)	8.6 \pm 0.6 ^a (44.1%)	3.7 \pm 0.5 (75.6%)	2.0 \pm 0.4 (%)	0.9 \pm 0.3 (%)
BC	10.5 \pm 0.7 (37.1%)	6.4 \pm 0.4 (35.9%)	3.2 \pm 0.5 (81.2%)	1.7 \pm 0.3 (100%)	1.3 \pm 0.4 (%)
T	12.4 \pm 1.1 (49.1%)	6.3 \pm 0.4 ^a (41.2%)	3.7 \pm 0.6 (94.5%)	1.6 \pm 0.3 (%)	0.7 \pm 0.2 (%)
TC	12.3 \pm 1.5 (44.7%)	7.9 \pm 0.6 (46.8%)	4.9 \pm 0.8 (79.5%)	2.2 \pm 0.5 (%)	0.5 \pm 0.1 (%)

Superíndices iguales en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a, b} $p < 0.05$

Tamaño medio de la muestra, $n = 35$.

Gráfico 20.- Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado (VR) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospermico tras su descongelación durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



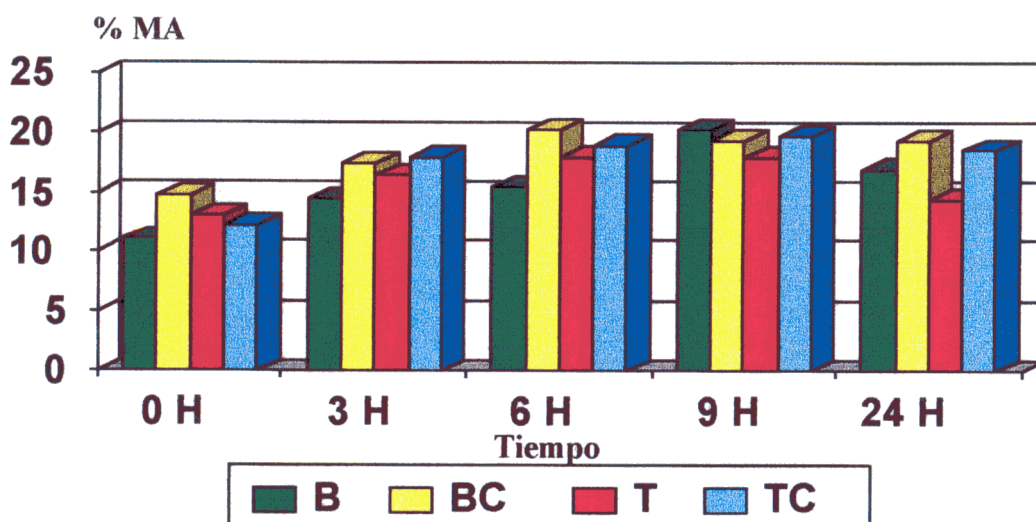
En la **Tabla 38** se muestra el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto (MA) encontrados tras la capacitación del semen descongelado. Se observa un aumento progresivo de esta variable a lo largo de toda la experiencia (**Gráfico 21**). Si bien no se observan diferencias significativas entre los distintos medios utilizados, se puede ver un aumento generalizado en los medios que han sufrido centrifugación previa a su congelación. El descenso observado en esta variable tras 24 horas de capacitación es debida a la pérdida del acrosoma como consecuencia de procesos degenerativos presentes tras la muerte celular.

Tabla 38.- Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto (MA) (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino descongelado en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

MA	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	11.1 \pm 1.1 (55.8%)	14.5 \pm 1.1 (46.2%)	15.5 \pm 1.3 (45.8%)	20.3 \pm 2.0 (54.6%)	17.0 \pm 1.3 (40%)
BC	14.8 \pm 1.1 (43.2%)	17.5 \pm 1.7 (49.7%)	20.3 \pm 1.9 (51.2%)	19.4 \pm 1.7 (46.3%)	19.4 \pm 1.7 (43.2%)
T	13.1 \pm 1.1 (48%)	16.5 \pm 2.0 (70.9%)	18.0 \pm 2.4 (48.8%)	18.0 \pm 1.9 (58.3%)	14.4 \pm 1.3 (40.2%)
TC	12.3 \pm 1.5 (66.6%)	18.0 \pm 1.6 (48.8%)	19.0 \pm 1.8 (46.8%)	19.8 \pm 1.8 (45.4%)	18.6 \pm 1.2 (33.3%)

Tamaño medio de la muestra, n= 35.

Gráfico 21.- Evolución del porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto (MA) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospérmico tras su descongelación durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC).



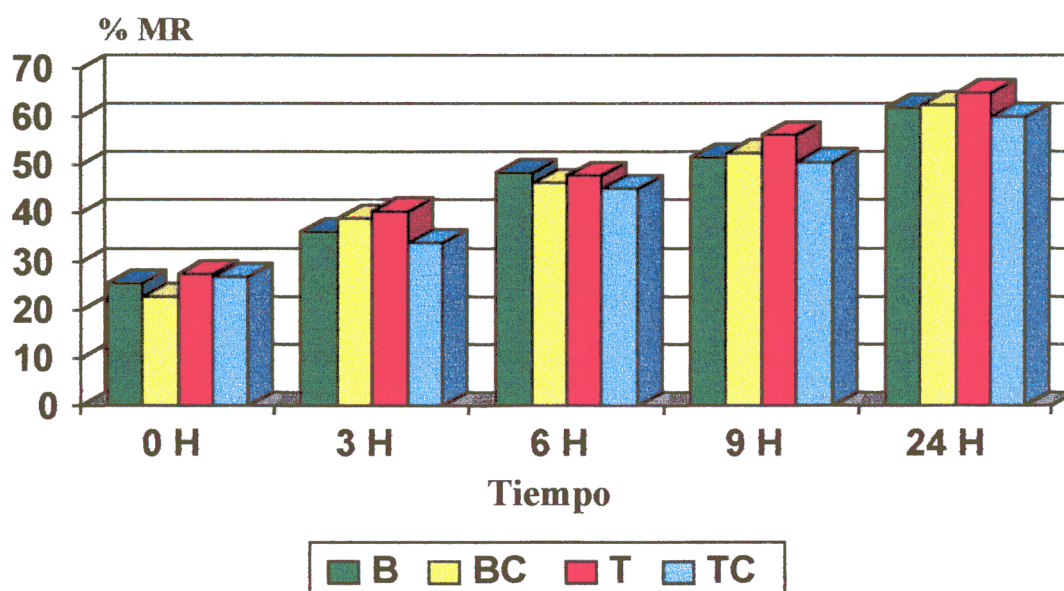
En la **Tabla 39** se muestra el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado obtenido a lo largo de 24 horas de capacitación. Se observa claramente una evolución ascendente de dicho parámetro en el transcurso de este estudio (**Gráfica 22**). No se encuentran diferencias significativas entre las distintas técnicas utilizadas, mostrando un comportamiento paralelo.

Tabla 39.- Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado (MR) (media \pm error estandar y coeficiente de variación) obtenidos durante 24 horas de capacitación espermática en semen caprino descongelado en BesKOH (B), BesKOH centrifugado (BC), TFC (T) y TFC centrifugado (TC).

MR	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
B	25.4 \pm 2.8 (60.2%)	36.0 \pm 1.8 (30.0%)	48.6 \pm 2.9 (32.5%)	51.6 \pm 3.3 (34.8%)	61.9 \pm 2.3 (18.7%)
BC	22.8 \pm 1.5 (36.4%)	39.0 \pm 2.5 (33.0%)	46.4 \pm 2.2 (25.0%)	52.5 \pm 2.3 (22.8%)	62.4 \pm 2.4 (18.5%)
T	27.4 \pm 1.8 (37.2%)	40.5 \pm 2.6 (37.2%)	48.0 \pm 2.4 (28.7%)	56.4 \pm 2.3 (22.3%)	65.0 \pm 1.8 (12.9%)
TC	26.7 \pm 1.8 (37.8%)	34.0 \pm 2.2 (36.1%)	45.1 \pm 3.0 (31.9%)	50.6 \pm 2.0 (20.3%)	60.0 \pm 1.9 (15.8%)

Tamaño medio de la muestra, n= 35.

Gráfico 22.- Evolución del porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado (MR) observado durante 24h de capacitación del semen caprino heterospermico tras su descongelación durante 2h 30' a +5°C en BesKOH sin centrifugación previa (B); BesKOH con centrifugación previa (BC); TFC sin centrifugación previa (T) y TFC con centrifugación previa (TC) .



4.1.3.7. Influencia de la congelación espermática sobre el perfil de capacitación de semen caprino.

Del estudio de los resultados encontrados sobre la influencia de las distintas metodologías de congelación empleadas sobre la capacitación del semen caprino, debemos resaltar la igualdad observada en prácticamente todos los parámetros analizados, existiendo diferencias puntuales entre alguna de las técnicas utilizadas. Tras este primer análisis, se procede a la determinación de las diferencias existentes en la capacitación espermática entre los distintos diluyentes y técnicas utilizadas en la congelación utilizadas (B, BC, T y TC) frente al semen fresco (**Tabla 40**). Se observa un descenso de la viabilidad espermática mas pronunciado en las muestras capacitadas que previamente han sufrido el proceso de congelación-descongelación frente al semen fresco. La permeabilidad de membrana mantiene valores similares tanto en el semen descongelado como en el fresco.

Tabla 40.- Estimación de la variabilidad existente en las distintas variables estudiadas, mediante comparación de medias, a lo largo del tiempo de capacitación en semen caprino fresco frente al descongelado para los distintos medios y técnicas utilizadas.

	0 H				3 H				6 H				9 H				24 H			
	F-B	F-BC	F-T	F-TC	F-B	F-BC	F-T	F-TC	F-B	F-BC	F-T	F-TC	F-B	F-BC	F-T	F-TC	F-B	F-BC	F-T	F-TC
EM	7.8***	10.2***	9.2***	9.7***	17.1***	20.1***	16.8***	13.5***	17.6***	21.3***	26.8***	23.9***	34.6***	31.4***	33.9***	27.6***	34.7***	34.2***	32.9***	28.8***
CM	10.5***	9.1***	8.9***	9.2***	12.4***	14.4***	14.6***	14.3***	8.4***	10.8***	11.4***	11.3***	10.1***	11.5***	11.5***	11.1***	21.5***	15.1***	17.4***	16.2***
EV	7.9***	9.9***	9.8***	7.6***	10.4***	11.7***	12.8***	13.5***	14.5***	14.6***	18.5***	15.7***	21.7***	18.8***	22.6***	26.9***	26.9***	26.1***	31.7***	22.5***
NAR	6.4***	11.6***	9.3***	10.5***	9.3***	14.0***	14.7***	11.7***	11.3***	17.3***	16.4***	17.3***	21.9***	22.7***	23.3***	26.0***	21.3***	21.0***	20.1***	21.7***
E+	-3.4**	-	-	3.1**	-	-	-	4.1***	-2.1*	-	2.5*	2.0*	-	-	2.4*	3.9***	-	2.8***	-	1.9°
VA	8.1***	13.7***	15.8***	13.7***	17.2***	16.9***	17.7***	16.7***	19.3***	20.5***	22.0***	16.8***	22.1***	20.5***	22.1***	18.9***	15.3***	18.0***	15.7***	16.7***
VR	-6.2***	-9.5***	-8.2***	-8.6***	-2.5*	-	-	-	6.7***	7.2***	6.4***	5.0***	4.6***	5.3***	5.3***	4.3***	2.0*	-	2.8**	3.7***
MA	-3.0**	-5.8***	-4.7***	-5.4***	-5.4***	-5.5***	-4.2***	-6.1***	-6.1***	-6.8***	-7.0***	-6.5***	-5.6***	-6.0***	-4.7***	-6.1***	-4.0***	-4.5***	-2.3*	-5.5***
MR	-5.7***	-8.8***	-9.8***	-9.4***	-12.5***	-10.8***	-10.9***	-9.8***	-14.3***	-14.4***	-13.8***	-10.7***	-10.1***	-14.0***	-15.1***	-15.2***	-12.1***	-9.5***	-16.0***	-13.7***

(-) No significativo; (°) $p < 0.1$; (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$

Debido a la escasa diferencia existente entre los distintos tratamientos de congelación previos a la capacitación del semen caprino se decide reunir todos los datos, procediéndose a continuación a su análisis a lo largo de las 24 horas de estudio (**Tabla 41**). Se observan diferencias significativas ($p < 0.01$) en casi todos los parámetros, siendo el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto, permeabilidad de membrana y espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado los que muestran a partir de las 3, 6 y 12 horas respectivamente una evolución no significativa.

Tabla 41.- Estimación de la variabilidad y nivel de significancia existente en los distintos parámetros observados en semen caprino congelado durante el período de capacitación (F -nivel de significancia).

	EM	CM	EV	NAR	E+	VA	VR	MA	MR
0-3 h	62.6**	4.2**	13.8**	19.0**	27.5**	20.4**	15.5**	4.8**	13.6**
3-6 h	51.3**	4.5**	26.8**	10.6**	3.1**	13.9**	11.7**	-	9.0**
6-9 h	11.0**	2.5**	6.3**	25.4**	-	2.0**	4.3**	-	2.4**
9-24 h	12.9**	17.9**	26.8**	14.2**	-	4.3**	-	-	5.8**

(-): No significativo; (**): $p < 0.01$

4.1.4. INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA SOBRE LA CAPACITACIÓN DEL SEMEN CAPRINO.

Una vez analizada la influencia de la refrigeración y congelación de las diferentes muestras seminales sobre la capacitación espermática, se procede a la exposición de la variabilidad existente de dichas técnicas de conservación y el semen fresco mediante un

análisis de varianza (**Tabla 42**). La capacitación del semen refrigerado presenta diferencias significativas ($p < 0.05$ y $p < 0.01$) en cuatro parámetros (endósmosis, porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma, vivos reaccionados y espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado) frente al fresco, siendo el resto de los parámetros similares entre si. Si bien la evolución que experimenta el porcentaje de vivos reaccionados es diferente para cada tipo de tratamiento, la proporción total de células espermáticas que sufren reacción acrosómica durante todo el período de incubación es similar, estando en torno al 25-30%.

Se observa un incremento de las diferencias existentes entre los resultados obtenidos del semen congelado frente al refrigerado y al fresco (**Tabla 42**). No se obtienen, por el contrario, diferencias en la permeabilidad de la membrana plasmática entre las muestras de semen fresco y el congelado a lo largo de todo el estudio, indicando una resistencia similar de la membrana espermática en ambos procesos.

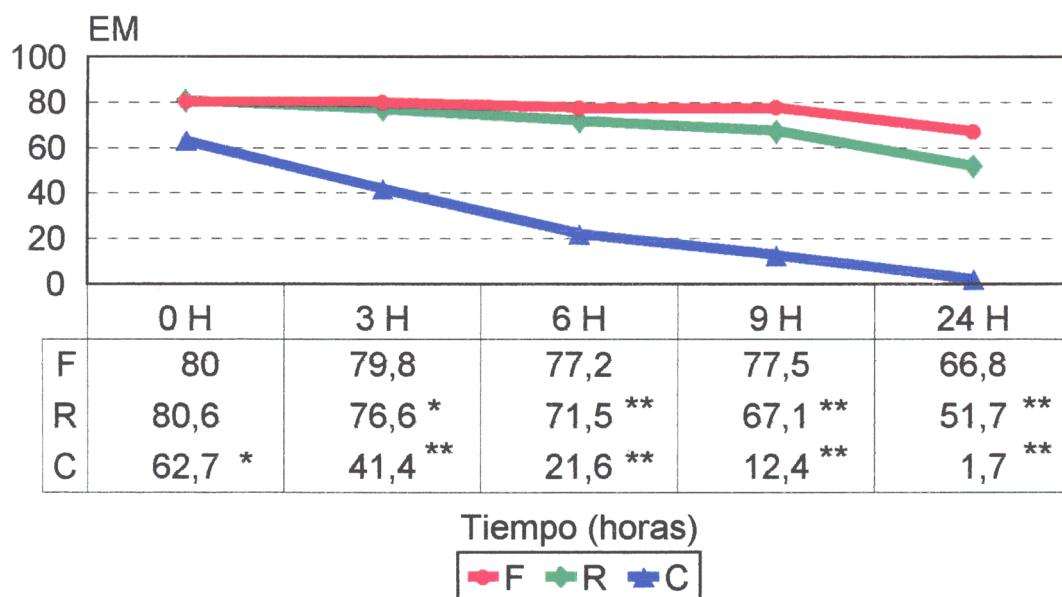
A continuación de la misma, se presentan una serie de gráficos ilustrativos de la variabilidad estimada durante las 24 horas de capacitación del semen caprino en las distintas condiciones experimentales.

Tabla 42.- Estimación de la variabilidad existente en las distintas variables estudiadas a lo largo de 24 horas de capacitación en semen caprino fresco (F), refrigerado (R) y descongelado (C).

	0 H			3 H			6 H			9 H			24 H		
	F-R	F-C	R-C	F-R	F-C	R-C	F-R	F-C	R-C	F-R	F-C	R-C	F-R	F-C	R-C
EM	-	98.5 ^{***}	150.4 ^{***}	4.2 ^{**}	267.0 ^{***}	413.6 ^{***}	5.0 ^{***}	465.1 ^{***}	730.1 ^{***}	13.6 ^{***}	583.6 ^{***}	775.7 ^{***}	27.6 ^{***}	488.9 ^{***}	650.9 ^{***}
CM	-	85.8 ^{***}	136.3 ^{***}	5.1 ^{***}	18.1.8 ^{***}	238.0 ^{***}	-	128.8 ^{***}	206.3 ^{***}	-	149.0 ^{***}	211.7 ^{***}	-	45.7 ^{***}	85.0 ^{***}
EV	-	40.6 ^{***}	83.3 ^{***}	3.3 ^{**}	109.2 ^{***}	145.7 ^{***}	5.2 ^{***}	218.8 ^{***}	317.4 ^{***}	7.7 ^{***}	190.6 ^{***}	269.9 ^{***}	-	36.3 ^{***}	55.3 ^{***}
NAR	-	63.5 ^{***}	117.0 ^{***}	-	119.0 ^{***}	182.7 ^{***}	-	197.1 ^{***}	304.1 ^{***}	16.2 ^{***}	288.9 ^{***}	308.5 ^{***}	21.9 ^{***}	214.1 ^{***}	221.7 ^{***}
E+	28.7 ^{***}	-	36.4 ^{***}	32.3 ^{***}	-	44.3 ^{***}	30.3 ^{***}	-	51.2 ^{***}	18.1 ^{***}	-	42.0 ^{***}	7.9 ^{***}	-	36.0 ^{***}
VA	6.6 ^{***}	131.0 ^{***}	135.3 ^{***}	12.4 ^{***}	199.4 ^{***}	219.4 ^{***}	10.8 ^{***}	268.3 ^{***}	330.6 ^{***}	14.5 ^{***}	290.2 ^{***}	286.2 ^{***}	7.3 ^{***}	73.5 ^{***}	74.5 ^{***}
VR	6.7 ^{***}	54.1 ^{***}	42.4 ^{***}	6.8 ^{***}	-	3.0 ^{***}	28.3 ^{***}	45.8 ^{***}	5.6 ^{***}	28.2 ^{***}	33.5 ^{***}	-	-	-	8.1 ^{***}
MA	-	20.4 ^{***}	19.8 ^{***}	4.8 ^{***}	26.6 ^{***}	16.8 ^{***}	7.1 ^{***}	37.7 ^{***}	23.3 ^{***}	6.7 ^{***}	32.3 ^{***}	15.9 ^{***}	4.2 ^{**}	13.2 ^{***}	5.5 ^{***}
MR	3.3 ^{**}	68.0 ^{***}	80.3 ^{***}	-	125.7 ^{***}	190.1 ^{***}	-	26.7 ^{***}	48.5 ^{***}	4.7 ^{***}	53.6 ^{***}	45.4 ^{***}	4.9 ^{***}	70.5 ^{***}	81.3 ^{***}

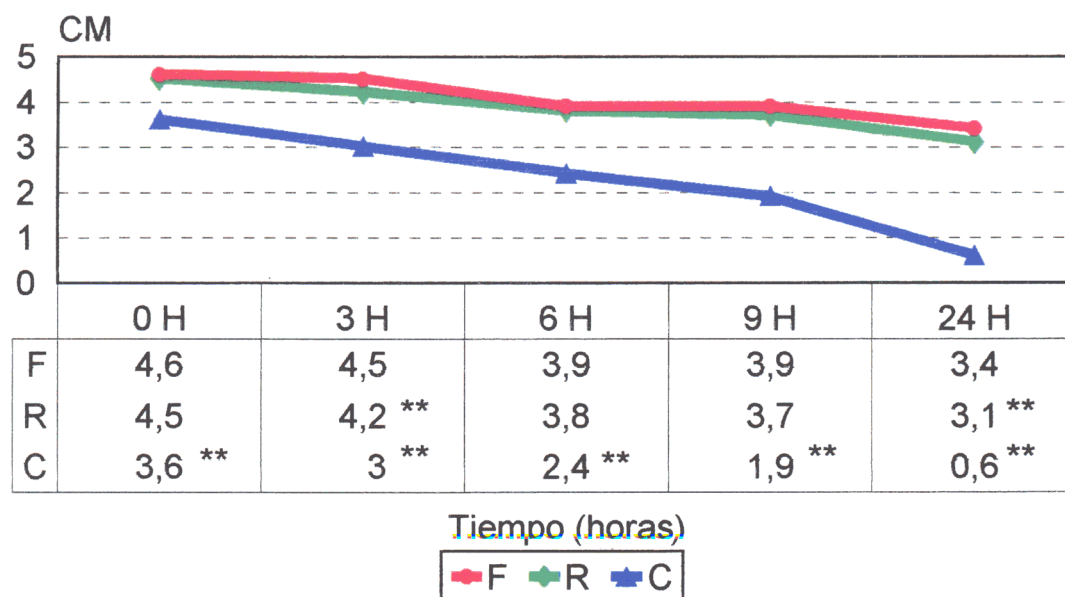
(-): No significativo; (**): $p < 0,05$; (***): $p < 0,01$

Grafico 23.- Porcentaje de espermatozoides moviles (EM) observados durante 24 horas de capacitacion en semen fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).



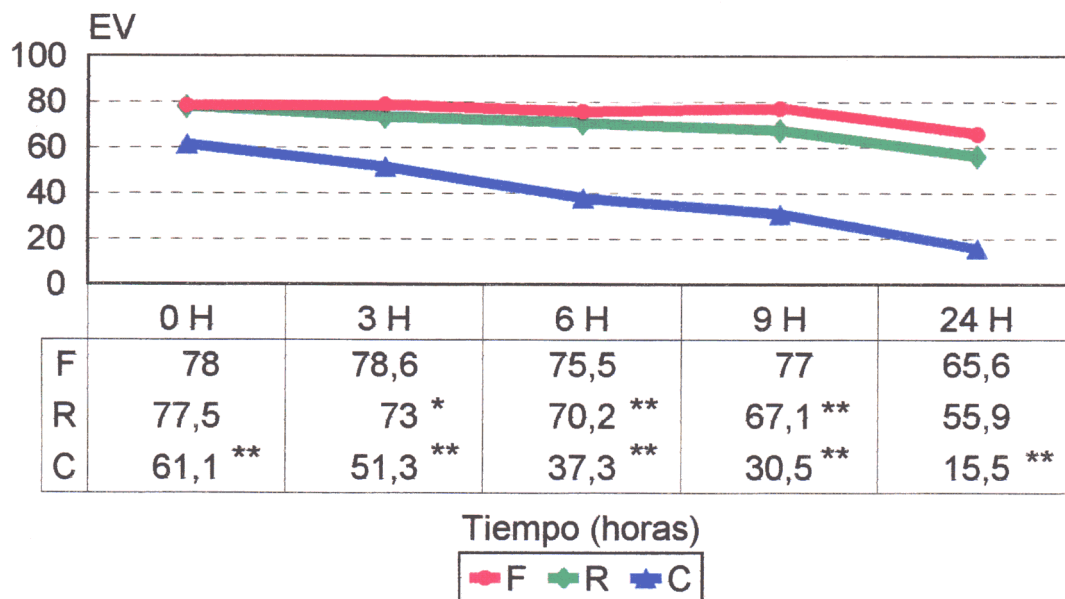
Diferencias significativas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Grafico 24.- Calidad de movimiento (CM) desarrollado por los espermatozoides durante 24 horas de capacitacion en semen fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).



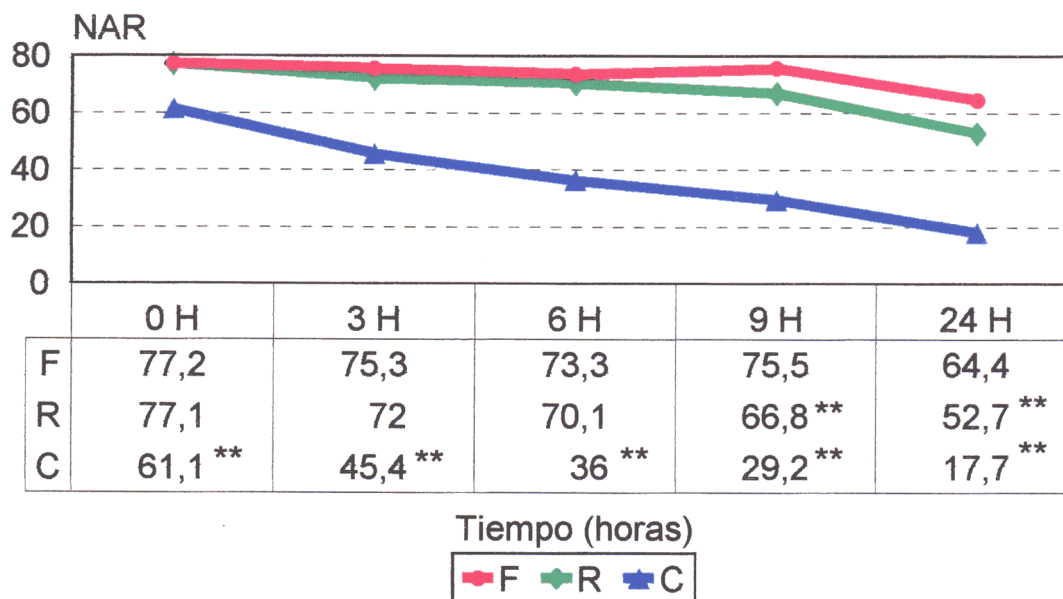
Diferencias significativas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Grafico 25.- Porcentaje de espermatozoides vivos (EV) observados durante 24 horas de capacitación en semen fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).



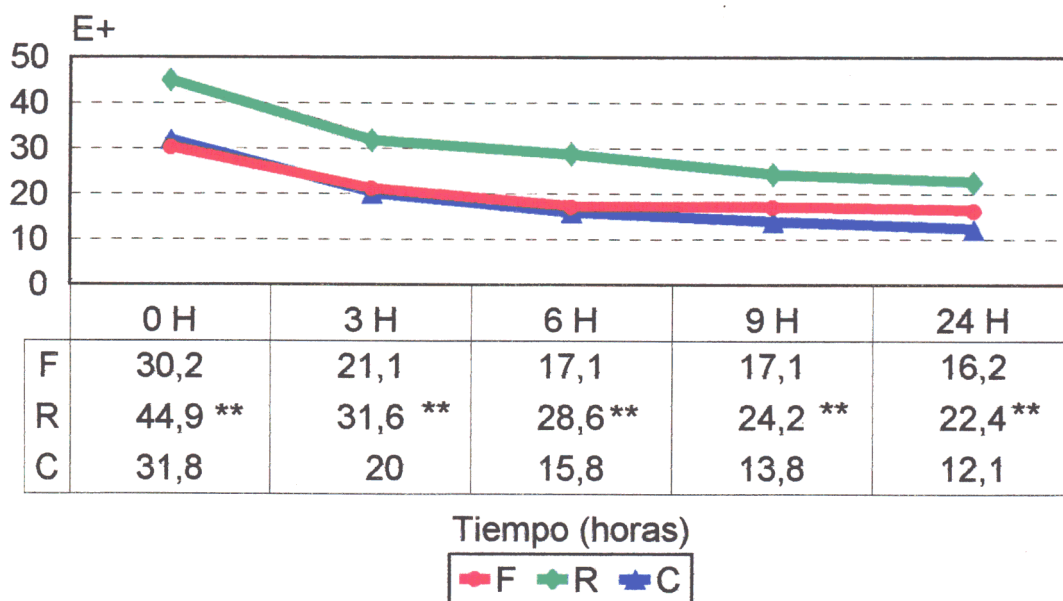
Diferencias significativas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Grafico 26.- Porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (NAR) observado durante 24 horas de capacitación en semen fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).



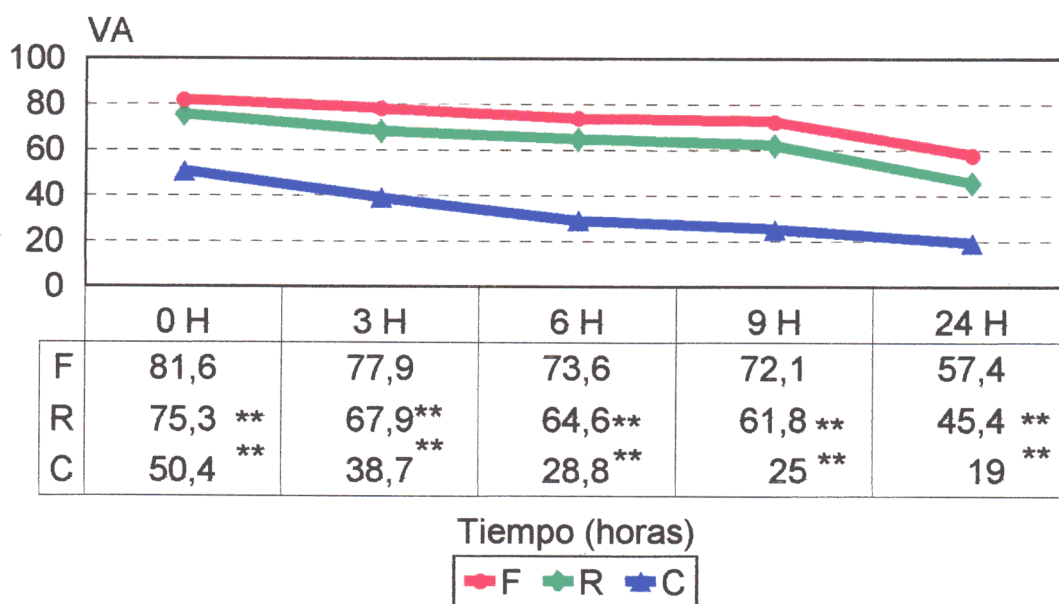
Diferencias significativas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Grafico 27.- Porcentaje de espermatozoides con endosmosis positivas (E+) observados durante 24 horas de capacitación en semen fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).



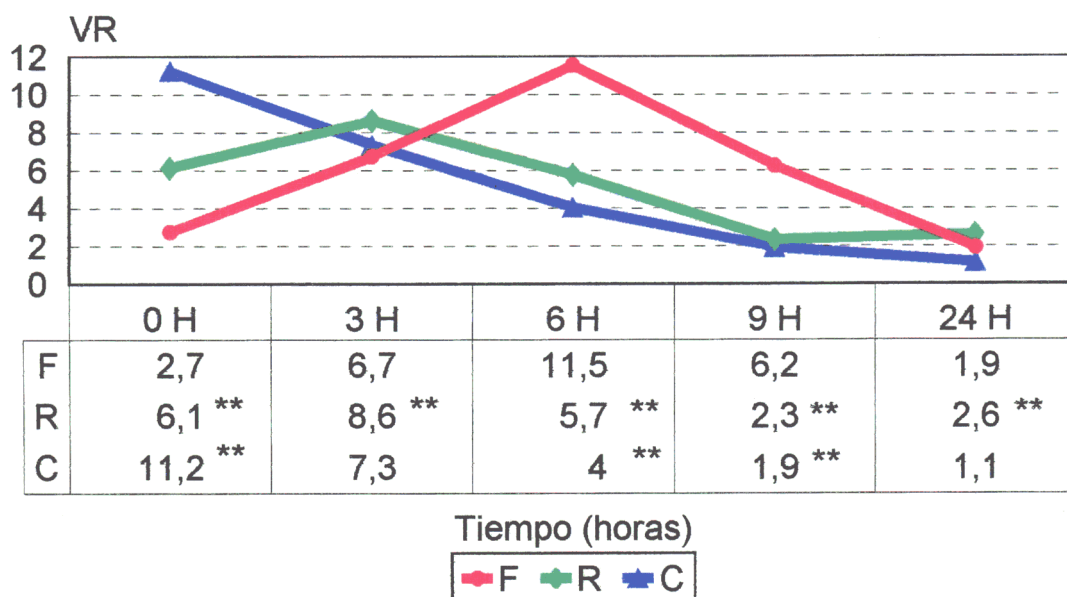
Diferencias significativas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Grafico 28.- Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma (VA) observado durante 24 horas de capacitación en semen fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).



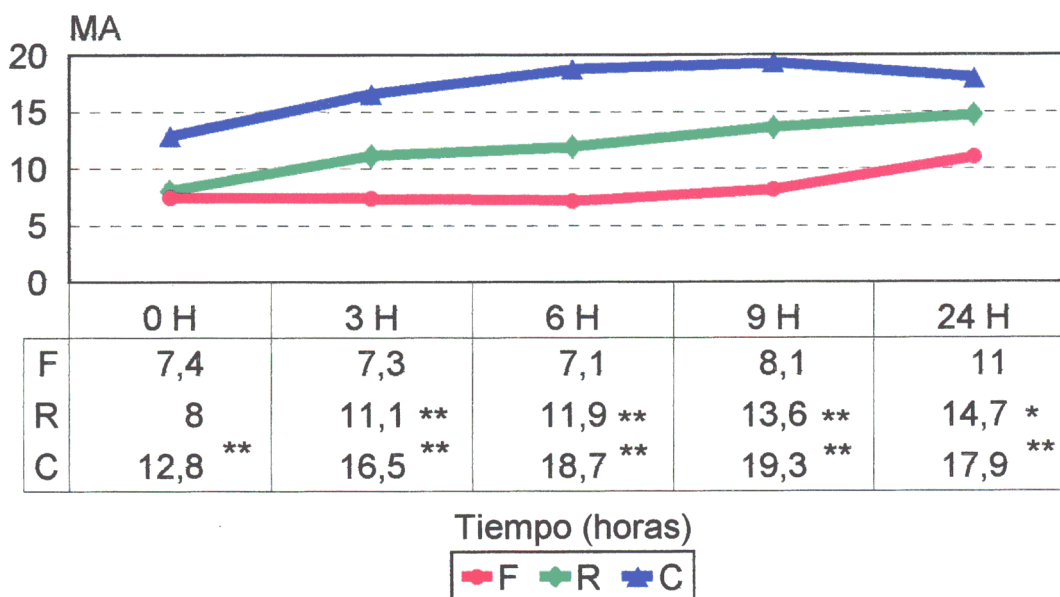
Diferencias significativas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Grafico 29.- Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado (VR) observados durante 24 horas de capacitación en semen fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).



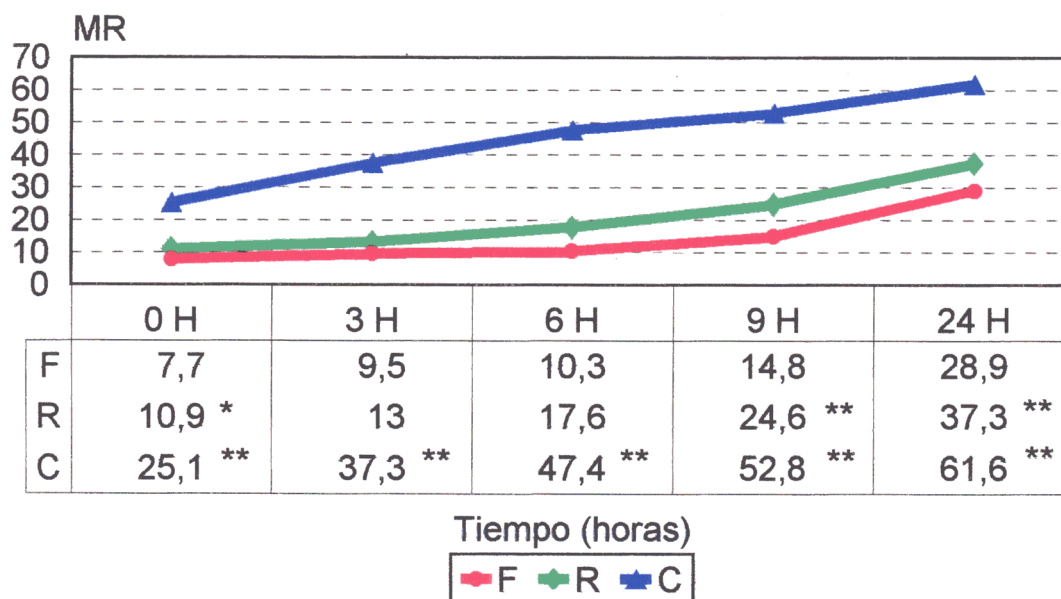
Diferencias significativas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Grafico 30.- Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma (MA) observado durante 24 horas de capacitación en semen fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).



Diferencias significativas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Grafico 31.- Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado (MR) observados durante 24 horas de capacitación en semen fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).



Diferencias significativas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

4.2. EFECTO INDUCTOR DEL Ca^{2+} IONÓFORO SOBRE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN SEMEN CAPRINO HETEROSPÉRMICO FRESCO, REFRIGERADO Y CONGELADO (TEST ARIC).

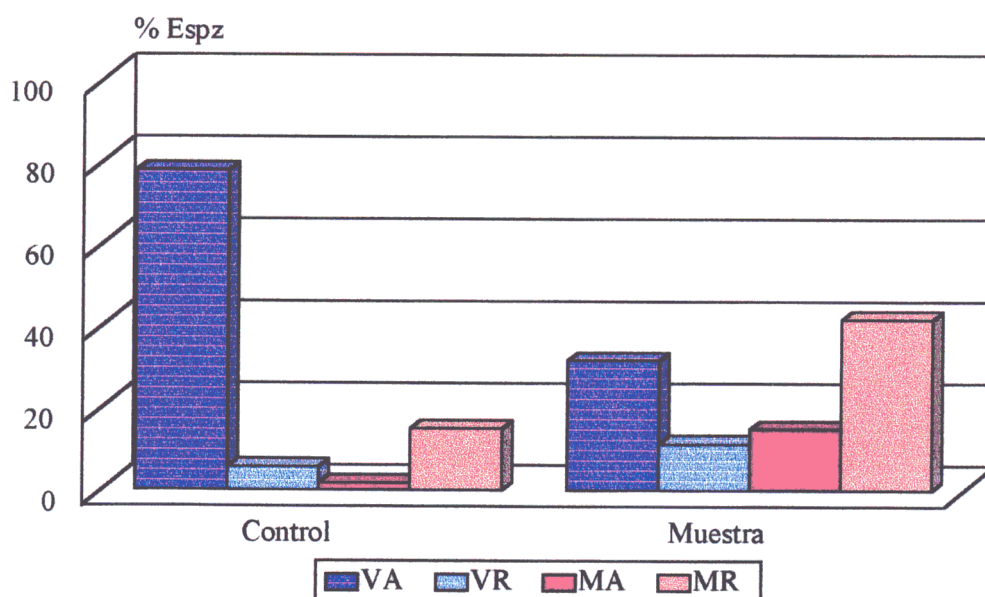
Los resultados obtenidos tras la inducción del semen fresco con Ca^{2+} ionóforo se reflejan en la **Tabla 43**. Se observa un aumento en el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados desde 1,6% en las muestras control hasta el 14,9% tras 10 minutos de incubación con el ionóforo, siendo el valor ARIC (% espermatozoides VR espontáneos - % espermatozoides VR inducidos) encontrado para el semen caprino fresco del 13,3%. En el **Gráfico 32** se observa la evolución experimentada por las diferentes categorías espermáticas.

Tabla 43.- Inducción de la reacción acrosómica con Ca^{2+} ionóforo ($10 \mu\text{M}/10 \text{ min.}$) en semen caprino fresco.

	VA	VR	MA	MR	ARIC
Control	77.8 ± 1.7 (7.4%)	1.6 ± 0.4 (91.75)	5.6 ± 0.9 (54.5%)	15.0 ± 1.2 (27.3%)	13.3 ± 1.6 (62.6%)
Muestra	31.6 ± 2.7 (44.2%)	14.9 ± 1.4 (48.8%)	11.3 ± 1.3 (58.7%)	41.7 ± 2.3 (28.1%)	

Tamaño medio de la muestra, $n= 32$.

Gráfico 32.- nducción de la reaccion acrosomica con ionoforo de calcio en semen caprino fresco.



La influencia de las distintas técnicas de refrigeración sobre la inducción de la reacción acrosómica se muestra en la **Tabla 44**. Tras el análisis de varianza realizado sobre las distintas muestras, no se observan diferencias significativas entre ninguna de las

técnicas de conservación aplicadas. Los valores ARIC obtenidos en todas ellas son próximos al 15%, encontrando los valores mayores en las muestras que han sido previamente centrifugadas frente a las que no (B: 14.6%; BC: 15.3%; T: 13.2%; TC: 16.5%).

Tabla 44.- Inducción de la reacción acrosómica con Ca^{2+} ionóforo ($10 \mu\text{M}/10 \text{ min.}$) en las diferentes metodologías de refrigeración empleadas: B, BC, T y TC.

	VA	VR	MA	MR	ARIC
B: Control	77.1 ± 3.7 (12.7%)	3.7 ± 0.9 (65.4%)	5.0 ± 0.8 (44.7%)	13.7 ± 2.9 (56.7%)	14.6 ± 1.6 (50.3%)
B: Muestra	35.1 ± 3.7 (49.2%)	18.0 ± 1.6 (41.2%)	11.4 ± 1.4 (56.2%)	35.4 ± 3.6 (47.1%)	
BC: Control	80.0 ± 3.7 (13.4%)	3.0 ± 0.5 (50.3%)	3.5 ± 0.5 (40.4%)	13.5 ± 3.4 (72.9%)	15.3 ± 1.9 (62.7%)
BC: Muestra	34.4 ± 3.6 (53.5%)	17.5 ± 1.4 (41.7%)	9.8 ± 0.9 (49.3%)	36.7 ± 3.7 (51.5%)	
T: Control	80.8 ± 2.7 (10.2%)	3.5 ± 0.6 (54.6%)	6.2 ± 1.1 (54.3%)	9.3 ± 1.8 (59.6%)	13.2 ± 1.1 (42.7%)
T: Muestra	41.4 ± 3.7 (43.8%)	16.2 ± 1.2 (36.4%)	9.4 ± 1.0 (52.6%)	32.6 ± 2.7 (41.4%)	
TC: Control	78.2 ± 2.4 (9.0%)	3.3 ± 0.7 (61.2%)	5.2 ± 0.6 (34.9%)	13.1 ± 2.0 (45.2%)	16.5 ± 1.8 (54.5%)
TC: Muestra	33.8 ± 3.5 (50.9%)	19.8 ± 1.8 (45.3%)	9.3 ± 1.2 (64.9%)	36.9 ± 3.1 (41.6%)	

Superíndices iguales en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a,b} $p < 0.05$; ^{x,y} $p < 0.01$

Tamaño medio de la muestra, $n = 32$.

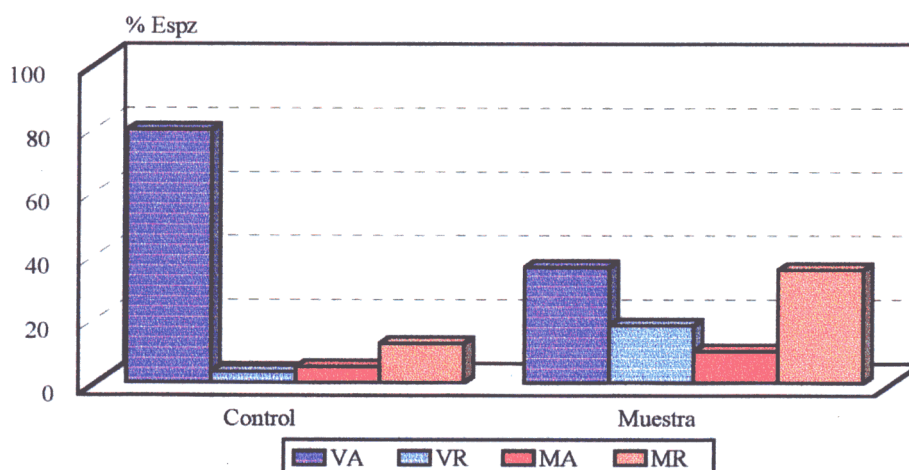
Debido a la falta de variaciones significativas entre las diversas metodologías empleadas, se procedió al análisis del efecto ejercido por la refrigeración, sin tener en cuenta la técnica, sobre la reacción acrosómica tras la aplicación del Ca^{2+} ionóforo (Tabla 45) cuya representación gráfica se muestra a continuación (Gráfico 33).

Tabla 45.- Inducción de la reacción acrosómica con Ca^{2+} ionóforo ($10 \mu\text{M}/10 \text{ min.}$) en semen caprino refrigerado.

	VA	VR	MA	MR	ARIC
Control	79.1 ± 1.5 (10.9%)	3.4 ± 0.3 (56.2%)	5.0 ± 0.4 (49.3%)	12.2 ± 1.2 (59.3%)	14.9 ± 0.8 (53.9%)
Muestra	36.1 ± 1.8 (49.1%)	17.9 ± 0.7 (41.8%)	9.9 ± 0.5 (55.6%)	35.4 ± 1.6 (45.4%)	

Tamaño medio de la muestra, $n = 32$.

Gráfico 33.- inducción de la reacción acrosómica con calcio ionóforo en semen caprino refrigerado.



Los resultados encontrados tras la inducción con Ca^{2+} ionóforo en muestras de semen caprino descongeladas se presentan en la **Tabla 46**. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las distintas metodologías de congelación utilizadas en ninguna de las categorías espermáticas. Los coeficientes de variación superiores al 100% no se reflejan en las tablas. La inducción observada no supera en ningún caso el

6%, obteniendo el valor mínimo en aquellas muestras congeladas en BesKOH sin centrifugar (1.3%) y el máximo en el mismo diluyente pero con lavado previo, BesKOH centrifugado (5.6%). Los resultados encontrados en las muestras congeladas con TFC, sin y con centrifugación, obtienen los valores más homogéneos (4% y 3%, respectivamente).

Tabla 46.- Inducción de la reacción acrosómica con Ca^{2+} ionóforo ($10 \mu\text{M}/10 \text{ min.}$) en las diferentes metodologías de congelación empleadas: B, BC, T y TC.

	VA	VR	MA	MR	ARIC
B: Control	56.0 ± 5.8 (23.2%)	14.6 ± 1.0 (15.4%)	6.0 ± 1.4 (52.7%)	23.2 ± 4.7 (45.8%)	1.3 ± 1.2
B: Muestra	25.7 ± 1.9 (29.3%)	16.1 ± 1.1 (27.1%)	7.0 ± 0.8 (48.8%)	51.0 ± 2.4 (18.5%)	
BC: Control	55.8 ± 4.2 (18.4%)	10.6 ± 1.1 (25.6%)	7.0 ± 2.7 (95.1%)	26.5 ± 4.6 (42.5%)	5.6 ± 1.5
BC: Muestra	21.5 ± 2.0 (38.8%)	15.9 ± 1.4 (37.9%)	10.2 ± 1.2 (50.2%)	52.1 ± 3.1 (24.6%)	
T: Control	53.0 ± 4.3 (20.2%)	10.6 ± 1.1 (25.6%)	10.1 ± 1.0 (25.2%)	26.1 ± 4.3 (40.3%)	4.0 ± 1.3
T: Muestra	26.1 ± 2.0 (34.5%)	14.5 ± 1.1 (34.5%)	10.2 ± 0.7 (31.2%)	49.6 ± 2.8 (24.1%)	
TC: Control	58.6 ± 5.0 (20.9%)	10.6 ± 0.9 (22.6%)	6.3 ± 0.9 (22.6%)	24.6 ± 5.0 (49.8%)	3.0 ± 0.9
TC: Muestra	23.0 ± 2.5 (47.1%)	13.3 ± 0.7 (24.6%)	10.0 ± 1.2 (40.0%)	53.5 ± 2.9 (23.1%)	

Superíndices iguales en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a,b} $p < 0,05$; ^{x,y} $p < 0,01$

Tamaño medio de la muestra, $n = 32$.

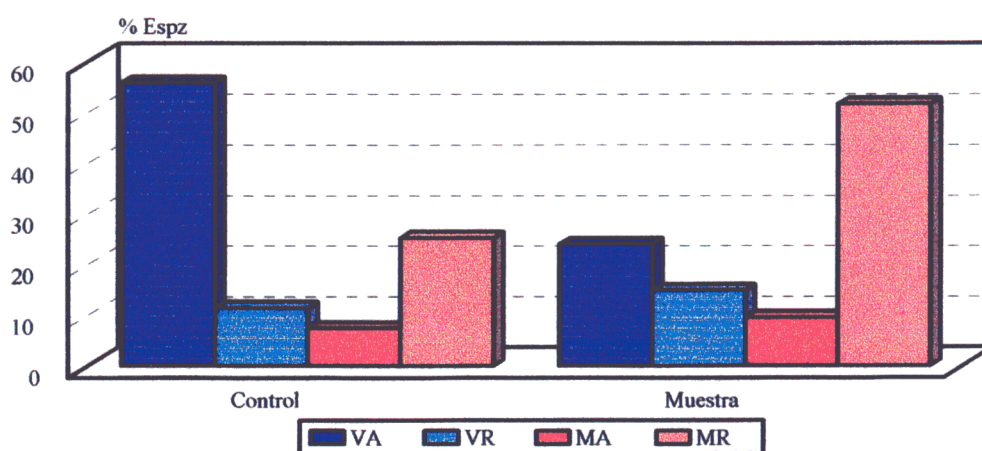
Debido a la falta de diferencias significativas encontradas entre las distintas técnicas de congelación utilizadas, se procedió al estudio de dichos resultados en su totalidad (**Tabla 47**). El máximo de espermatozoides vivos reaccionados en semen congelado se obtiene a las 0 horas de incubación, por lo que el incremento de la reacción acrosómica debida a la inducción por el Ca^{2+} ionóforo es pequeña (3.5%). La evolución de las distintas variables se muestra en el **Gráfico 34**.

Tabla 47- Inducción de la reacción acrosómica con Ca^{2+} ionóforo ($10 \mu\text{M}/10 \text{ min.}$) en semen caprino congelado.

	VA	VR	MA	MR	ARIC
Control	55.8 ± 2.2 (19.6%)	11.4 ± 0.6 (25.7%)	7.4 ± 0.9 (59.7%)	25.2 ± 2.1 (41.7%)	3.5 ± 2.1 (41.7%)
Muestra	24.0 ± 1.0 (37.6%)	14.9 ± 0.5 (32.2%)	9.5 ± 0.5 (43.7%)	51.6 ± 1.4 (22.6%)	

Tamaño medio de la muestra, $n = 32$.

Gráfico 34.- Inducción de la reacción acrosómica con ionóforo de calcio en semen caprino congelado.



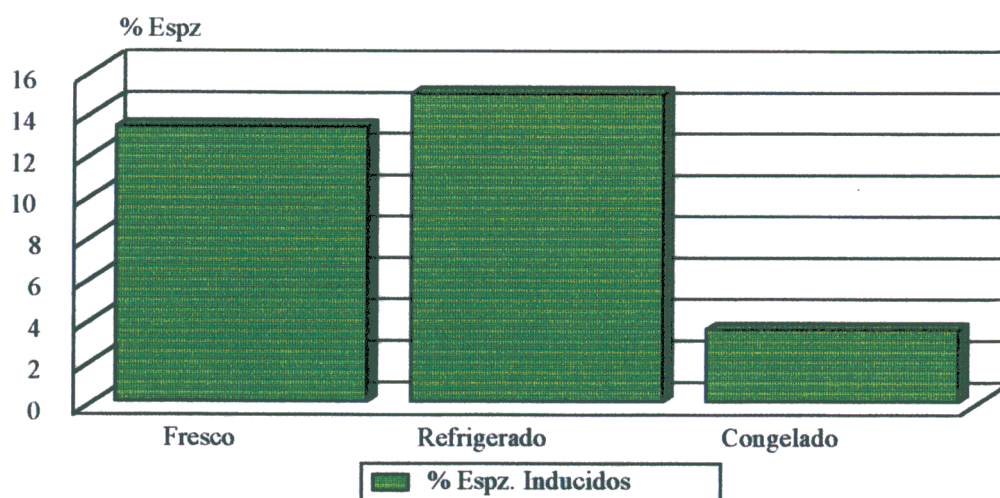
Dada la importancia fisiológica que tiene la inducción de la reacción acrosómica, o reacción acrosómica verdadera, se procedió a continuación al estudio de la variabilidad existente en dicha inducción entre el semen fresco, refrigerado y congelado (**Tabla 48**). No se observan diferencias significativas entre la reacción acrosómica inducida en el semen fresco y refrigerado (**Gráfico 35**), si bien se estiman dichas diferencias ($p < 0.01$) entre ambas y el congelado.

Tabla 48.- Estimación de la variabilidad existente en la inducción al Ca^{2+} ionóforo en semen caprino dependiendo del tipo de conservación aplicada (F nivel de significancia).

	F-R	F-C	R-C
ARIC	-	16.7**	47.1**

(-): No significativo; (**): $p < 0,01$

Gráfico 35.- Porcentaje de inducción de espermatozoides vivos reaccionados mediante el test ARIC en semen fresco, refrigerado y congelado



4.3. FECUNDACIÓN “IN VITRO” CON SEMEN CAPRINO CAPACITADO. CORRELACIÓN CON OTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.

Los ovocitos de hamster empleados en la realización de la tercera experiencia fueron descongelados media hora antes de su utilización, siendo la tasa de recuperación obtenida del 80%.

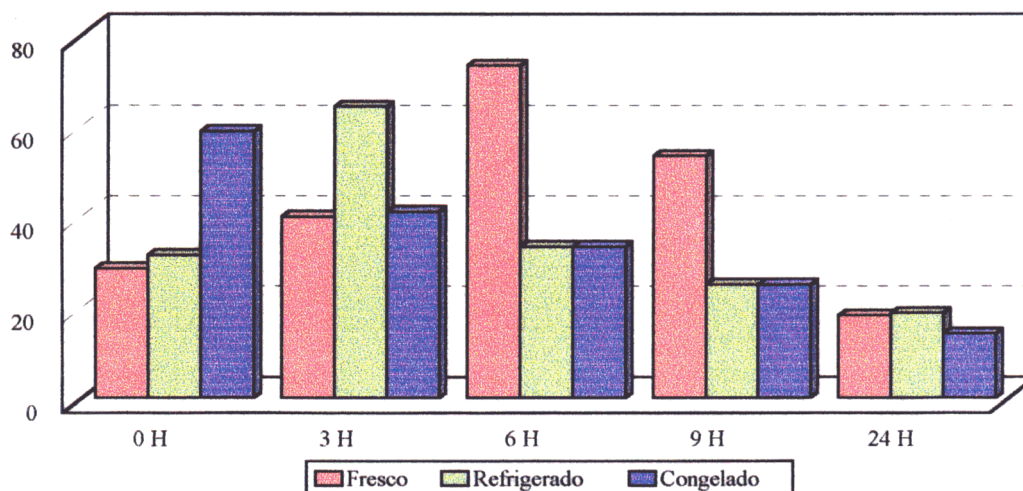
Los resultados obtenidos de la fecundación “in vitro” de ovocitos de hamster con espermatozoides procedentes de muestras de semen fresco, refrigerado y congelado, tras 4-5 horas de coincubación, se reflejan en la **Tabla 49**. Debido a la falta de diferencias significativas existentes durante la capacitación (apartado 4.1) e inducción de la reacción acrosómica (apartado 4.2.) entre la distintas técnicas de conservación espermática utilizadas (B, BC, T y TC), se utilizó el diluyente Tris-Fructosa-Cítrico, sin lavado previo de las distintas muestras seminales, para la realización del test de hamster en semen refrigerado y congelado. Se observa un desplazamiento hacia la derecha del porcentaje de penetración tras la refrigeración y congelación de las diferentes muestras seminales frente al fresco (**Gráfico 36**).

Tabla 49.- Porcentaje de penetración obtenido tras la coincubación de ovocitos de hamster con semen caprino fresco, refrigerado y congelado.

	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
Fresco	28.5	40.0	73.3	53.3	18.1
Refrigerado	31.5	64.2	33.3	25	18.7
Congelado	58.8	41.1	33.3	25.0	14.2

ovocitos de hamster, n= 15.

Gráfico 36.- Porcentaje de penetración en ovocitos de hamster tras el cocultivo con semen caprino fresco, refrigerado y congelado.



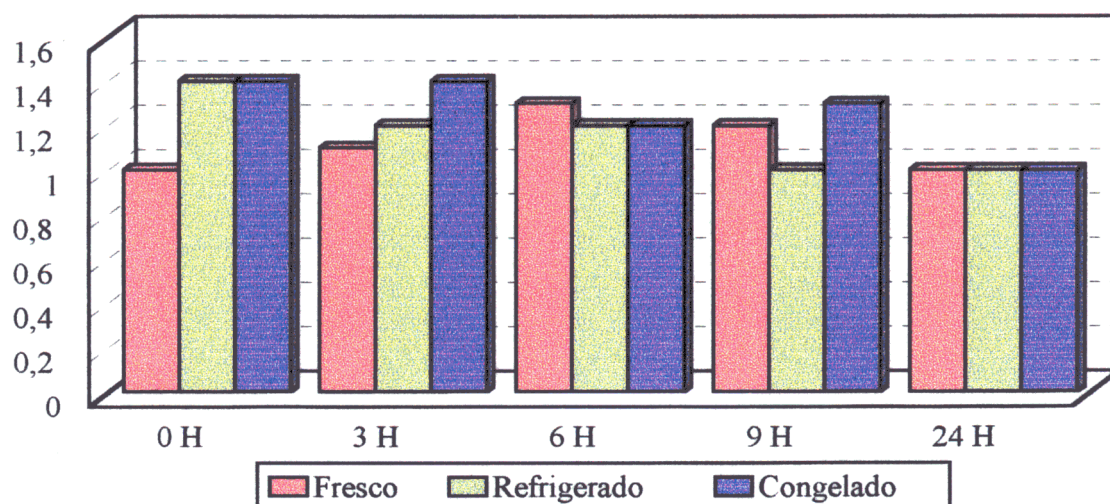
Los resultados obtenidos por el índice de fertilidad en los diferentes tratamientos seminales utilizados se reflejan en la **Tabla 50**. Si bien, en semen fresco se observa una curva cuyo máximo se halla situado a las 6 horas de preincubación espermática (1.3), la conservación del semen condiciona la aparición de valores máximos al comienzo de la experiencia, para descender a continuación a lo largo del período de incubación (**Gráfico 37**).

Tabla 50.- Índice de penetración obtenido tras la coincubación de ovocitos de hamster con semen caprino fresco, refrigerado y congelado.

	0 H	3 H	6 H	9 H	24 H
Fresco	1.0	1.1	1.3	1.2	1.0
Refrigerado	1.4	1.2	1.2	1.0	1.0
Congelado	1.4	1.4	1.2	1.3	1.0

ovocitos de hamster, n= 15.

Gráfico 37.- Índice de penetración en ovocitos de hamster tras el cocultivo con semen caprino fresco, refrigerado y congelado.



Tras este primer análisis, se procedió al estudio de las correlaciones existentes entre las distintas metodologías empleadas y el test de hamster. Debido a las grandes diferencias encontradas entre los tres tipos de tratamiento seminales desarrollados en este trabajo, en prácticamente todas las variables analizadas, se procedió a la realización de la correlación entre el semen fresco, refrigerado y congelado de manera independiente.

Los resultados encontrados para el porcentaje de penetración se presentan en la **Tabla 51**. La proporción de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado (VR) presenta correlaciones positivas en las tres condiciones experimentales utilizadas con una r siempre superior al 0.90. Los resultados encontrados en el semen congelado muestran una mayor sensibilidad de todas las variables diagnósticas empleadas en determinación del poder fecundante de una muestra (a excepción del porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma), mostrando altas correlaciones con el porcentaje de penetración en ovocitos de hamster.

Tabla 51.- Correlación existente entre el porcentaje de penetración (PP) y las diferentes pruebas diagnósticas de la calidad espermática para los distintos tratamientos espermáticos: fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).

	MV	CM	TV	NAR	E+	VA	VR	MA	MR
F	-	-	-	-	-	-	0.95	-	-
R	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-
C	0.98	0.96	0.98	0.99	0.92	0.99	0.96	-	-0.99

El análisis de los resultados obtenidos de la correlación entre el índice de penetración (IP) y el resto de las variables utilizadas en semen fresco, refrigerado y congelado se muestran en la **Tabla 52**, no observando ningún patrón de comportamiento entre ninguno de los tratamientos seminales utilizados y el IP. Es el porcentaje de espermatozoides que presentan endósmosis positiva en semen refrigerado el que presenta una mayor correlación con el índice de penetración ($r = 0.96$).

Tabla 52.- Correlación existente entre el índice de penetración (IP) y las diferentes pruebas diagnósticas de la calidad espermática para los distintos tratamientos espermáticos: fresco (F), refrigerado (R) y congelado (C).

	MV	CM	TV	NAR	E+	VA	VR	MA	MR
F	-	-	-	-	-	-	0.94	-	-
R	-	-	-	-	0.96	-	-	-0.97	-
C	-	0.91	0.89	-	-	-	-	-	-

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. EFECTO DE LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN DEL SEMEN CAPRINO SOBRE SU PERFIL DE CAPACITACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA “IN VITRO”.

La refrigeración y congelación de eyaculados procedentes de machos cabrios como medio de conservación espermática, y su posterior utilización mediante IA, ha sido objeto de numerosos estudios (Corteel, 1981; Ritar y Salamon, 1982; Maxwell y Evans, 1990; Nunes, 1993a; Singh et al., 1995; Roca et al., 1996). Dentro de este amplio marco de referencias, la elección del diluyente adecuado y sus resultados de fertilidad son los que ocupan el mayor número de publicaciones (Corteel, 1975; Chauhan y Anand, 1990; Ritar y Ball, 1993; Nunes, 1993 a; Singh et al., 1995; Sinha et al., 1995). Sin embargo, a pesar de la gran importancia que la capacitación y reacción acrosómica espermática tienen sobre la fusión gamética, la información acerca de la influencia ejercida por los diluyentes y metodologías de conservación espermática sobre dichos eventos es muy reducida en el ganado caprino (Anand et al., 1989; Kusunoki et al., 1989; Martín Lunas et al., 1996).

La determinación del tiempo requerido para la capacitación e inducción de la reacción acrosómica es esencial para el conocimiento de la fisiología espermática, observándose variaciones en función de la especie estudiada (Cummins, 1995), entre los individuos de la misma especie (Takahashi et al., 1992; Garde 1992 b), procedencia de los espermatozoides (eyaculados o epididimarios) (Anand et al. 1989; Aguado et al., 1994b), así como entre los espermatozoides de un mismo eyaculado (Cummins, 1995).

La marcada homogeneidad observada en nuestro trabajo entre las distintas

técnicas estudiadas (B, BC, T y TC) es indicativa de una influencia similar de los diluyentes amídicos sobre la capacitación (**Berg et al., 1990**), así como del escaso efecto ejercido por la centrifugación como método de lavado previo a la conservación espermática sobre este proceso. No observamos diferencias pronunciadas entre los diluyentes utilizados en la refrigeración y congelación de las diferentes dosis (BesKOH y Tris-Fructosa-Cítrico), limitándose a presentar diferencias significativas puntuales en determinados tiempos de capacitación, lo que indica una sensibilidad del semen caprino a la conservación espermática pero no al diluyente usado. Resultados similares han sido observados por **Hinsch et al. (1997)** en semen congelado de toro, no encontrando dichos autores diferencias en el estado de capacitación entre dosis seminales congeladas con Triladyl y Biociphos.

Por otra parte, la eliminación del plasma seminal mediante centrifugación no muestra beneficios significativos frente a las alícuotas que no han sido lavadas, corroborando nuestros resultados los trabajos de **Chauhan y Anand (1990)** y **Roca et al. (1994)**; mientras que implica un aumento en el coste y tiempo requerido para preparación de las diferentes muestras seminales. Así, la exclusión de los factores de decapitación mediante el lavado seminal estimularía la capacitación espermática (**Carbonero y Vázquez, 1984**), en tanto que la introducción de la yema de huevo como crioprotector en dichas muestras reforzaría la resistencia de la membrana plasmática, inhibiendo dicho estímulo hasta el momento de la preincubación (**Tesarik y Mendoza, 1995**). **Ritar y Salamon** observaron en 1982 un efecto beneficioso de la centrifugación sobre la viabilidad espermática, siendo este mismo dependiente de la intensidad de la técnica; sin embargo estudios más recientes encuentran un efecto desfavorable en las muestras previamente centrifugados tras su descongelación sobre la movilidad e integridad acrosómica (**Tuli y Holtz, 1994**). **Roca et al. (1994)** observan una evolución similar de la calidad seminal en los eyaculados con y sin lavado previo durante 96 horas,

obteniendo un 76% de fertilidad en cabras Murciano-Granadinas tras la utilización de semen no lavado refrigerado a +5°C.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran además, un descenso de la movilidad y vitalidad en las muestras sometidas a conservación, siendo este efecto mucho más pronunciado cuando las dosis han sido congeladas, indicando el aumento del daño celular debido a los fenómenos físicos y químicos que se producen durante la congelación-descongelación, apoyando los trabajos de **Garde (1992 b)** en semen de morueco y de **Hinsch et al. (1997)** en semen de toro. Sin embargo **Zavos et al. (1995)** comprueban la existencia de un aumento cualitativo de las características seminales en muestras previamente refrigeradas frente al semen fresco. La adición de la yema de huevo a los medios de conservación es empleada para la protección de la membrana plasmática frente al choque frío durante los procesos de refrigeración y congelación, si bien es necesario la utilización de porcentajes bajos de yema de huevo en el semen caprino para evitar el efecto negativo debido a la fosfolipasa A en las muestras en las que no ha sido eliminado previamente el plasma seminal (**Corteel, 1980; Ritar y Salamon, 1982; Roca et al., 1994**). Dicha protección se refleja en nuestro estudio en una disminución del porcentaje de espermatozoides con endósmosis negativa durante la capacitación del semen refrigerado frente al encontrado en semen fresco al comienzo de nuestra experiencia, siendo nuestros resultados contrarios a los observados por **Gamzu et al. (1994)**, ya que dichos autores no obtienen un descenso significativo del porcentaje de endósmosis negativa tras someter al semen humano a una preincubación de 2 horas a temperatura ambiente en un diluyente con yema de huevo. El descenso en el porcentaje de espermatozoides con endósmosis negativa se ve reducido en las muestras expuestas a los procesos de congelación-descongelación, haciéndose eco de los daños mecánicos producidos en la membrana espermática por acción de los cristales de hielo (**Vázquez et al., 1989; Donoghue et al., 1996; Correa et al., 1996 b**), no observando diferencias

significativas ($p>0.05$) entre los valores de endósmosis positiva encontrados en el semen fresco y el congelado.

El efecto producido por los diversos procedimientos de conservación, se pone de manifiesto principalmente en la aceleración de la capacitación y disminución de la viabilidad espermática ($p<0.05$ y $p<0.01$). Las células espermáticas procedentes de dosis congeladas son potencialmente fértiles tras su descongelación, mientras que las muestras refrigeradas y frescas necesitan un periodo de capacitación de 3 horas y 6 horas respectivamente, para adquirir dicha característica. El desplazamiento hacia la izquierda de la curva de capacitación del semen caprino observada en nuestro estudio (**Gráfico 29**), representado por el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados, es similar al observado por **Garde (1992 b)** en semen ovino de raza Manchega. Dicho autor, obtiene el máximo de espermatozoides reaccionados en semen refrigerado a las 6 horas de capacitación, frente al obteniendo en el semen congelado a las 0 horas, reflejando una cierta similitud entre ambas especies. Sin embargo, nuestros resultados están en discordancia con los observados por **Martin-Lunas et al. (1996)** en semen caprino, ya que dichos autores no observan ningún aumento significativo en el porcentaje de reacción acrosómica espontánea durante las primeras 4 horas de preincubación y sí tras 17 horas de coincubación con ovocitos. No obstante, la falta de tiempos intermedios entre ambas observaciones nos impide conocer la evolución de la capacitación en dichas muestras entre ambos tiempos, oscilando el máximo de reacción acrosómica encontrado en torno al 10% a las 21h (4h princubación + 17h coincubación).

La refrigeración espermática condiciona también una disminución de su respuesta máxima espontánea, corroborando los resultados obtenidos por **Tesarik y Mendoza (1995)** en semen humano. El descenso observado en el porcentaje de células espermáticas reaccionadas de forma espontánea puede ser debida al efecto protector que

las lipoproteínas presentes en la yema de huevo ejercen sobre la membrana plasmática, inhibiendo el inicio de la reacción acrosómica hasta la llegada de un factor capacitante que dispare dicho proceso. Por ello, los diluyentes suplementados con yema de huevo son utilizados en semen humano para el tratamiento de infertilidades asociadas a la aparición de altos porcentajes de reacción acrosómica espontánea (Bielfeld et al., 1990; Tesarik y Mendoza, 1995) así como para reducir las anomalías acrosomales asociadas a la manipulación del semen "in vitro" (Barak et al., 1995), observándose un incremento de la capacidad de unión de los espermatozoides al ovocito (Gamzu et al., 1994).

La capacitación prematura experimentada por los espermatozoides sometidos a procesos de refrigeración y congelación puede ser debida al choque térmico (Sánchez y Schill, 1991 a; Cummins, 1994; Pérez et al., 1996; Valcárcel et al., 1997), a la acción capacitante del glicerol (Slavik, 1987; Garde, 1992 b) y/o de los compuestos amídicos que forman parte del diluyente (Berg et al., 1990). La inducción de la reacción acrosómica como consecuencia de la presencia de glicerol en el medio puede deberse a su unión con los ácidos grasos libres, lo que inestabilizaría la membrana espermática (Slavik, 1987) o al aumento de la presión osmótica del medio tras su adición (Aitken et al., 1983). En nuestro estudio, la utilización de diluyentes que contienen glicerol en su composición, tanto en semen refrigerado como en el congelado (a pesar de no ser necesaria su presencia en los medios de refrigeración), elimina las posibles diferencias debidas a este crioprotector entre ambos procesos de conservación (refrigeración y congelación), evidenciando la acción capacitante del choque térmico, estando nuestro trabajo de acuerdo con Sánchez y Schill, (1991 a), Pérez et al. (1996) y Valcárcel et al. (1997).

La disminución observada en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto durante la capacitación del semen fresco y conservado no se ve

reflejado en un aumento simultáneo de la población de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado, indicando la evolución de los primeros hacia espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado, considerados como potencialmente fértiles. Si bien, tanto la proporción de células espermáticas vivas con acrosoma intacto como muertas con acrosoma reaccionado muestran una evolución paralela en el tiempo para los distintos tratamientos (fresco, refrigerado, congelado), el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado evoluciona de forma independiente, reflejando la influencia ejercida por los diluyentes y bajas temperaturas sobre la capacitación espermática.

Considerando que el tiempo transcurrido entre el inicio y final de la reacción acrosómica en un espermatozoide es de aproximadamente 3 minutos (Curry y Watson, 1995), y que la vida media de los espermatozoides reaccionados no asociados al ovocito es corta (Didion y Graves, 1986; Cummins, 1995) se puede decir, que los porcentajes de células espermáticas vivas con acrosoma reaccionado detectados durante la capacitación del semen caprino en los distintos tiempos de observación son independientes (Cummins, 1994). Esta información pone de manifiesto la existencia de una asincronía en la reacción acrosómica de las diversas poblaciones espermáticas (Cummins, 1995), apoyando nuestros resultados dicha teoría. Observaciones similares han sido encontradas por Garde (1992 b) en semen ovino, Kusunoki (1989) en semen caprino y por Tesarik (1989) en eyaculados humano. Así, independientemente de la curva de capacitación observada en cada tratamiento seminal de nuestro estudio, el total de espermatozoides susceptibles a sufrir la reacción acrosómica en semen caprino es similar en todas ellas, estando su valor alrededor del 25-30%.

5.2. EFECTO INDUCTOR DEL Ca^{2+} IONÓFORO SOBRE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN SEMEN CAPRINO HETEROSPÉRMICO FRESCO, REFRIGERADO Y CONGELADO (TEST ARIC).

La inducción de la reacción acrosómica "in vitro" en espermatozoides de mamífero es utilizada principalmente como prueba diagnóstica de la capacidad fecundante de un eyaculado (Aitken et al., 1984; Cummins, 1995; Whitfield y Parkinson, 1995), siendo ésta y no la espontánea la que tiene un significado biológico (Tesarik, 1989). La respuesta de los espermatozoides al Ca^{2+} ionóforo es debida a la inducción de un flujo de calcio hacia el interior de las células espermáticas, estimulando la RA (Cummins, 1994; Carrell et al., 1996), siendo su efecto dependiente de la concentración, tiempo de incubación, especie utilizada y condiciones de estudio (Aitken et al., 1984; Hanada, 1985; Bawa et al., 1993; Bielfeld et al., 1994; Fraser et al., 1995; Tatenó y Kamiguchi, 1996; Valcárcel et al., 1996), existiendo una gran variabilidad de su respuesta dependiendo de la calidad seminal de la que se parte (Troup et al., 1994; Parinaud et al., 1995).

En nuestro estudio no observamos diferencias significativas en las distintas categorías espermáticas detectadas mediante la triple tinción entre ninguna de las técnicas de conservación seminal utilizadas (B, BC, T y TC), indicando la escasa influencia del lavado seminal (previo a su conservación) y del diluyente utilizado sobre la inducción de la reacción acrosómica, al igual que ocurriera con la reacción acrosómica espontánea. La homogeneidad observada en la respuesta al Ca^{2+} ionóforo en los cuatro tipos de conservación espermática utilizados puede ser debida a las condiciones de capacitación, siendo el tipo de proteína presente en el medio de incubación y su concentración las que influyen de manera mas relevante sobre la estimulación de la reacción acrosómica (Roldán et al., 1989; Cummins, 1995).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran un incremento del 10-15% de espermatozoides reaccionados tras la incorporación del Ca^{2+} ionóforo A23187 (1 mM/10 minutos) a las diferentes alícuotas procedentes de semen caprino fresco y refrigerado, siendo el valor total medio obtenido de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado tras dicha inducción del 15% y 20% respectivamente. Estos resultados son superiores a los encontrados por **Martín-Lunas et al. (1996)** cuya inducción del 9-10% ha sido conseguida utilizando ovocitos de cabra tras 17 horas de coincubación con semen fresco. Valores similares a los encontrados en nuestro estudio en semen fresco han sido obtenidos por **Kusunoki et al. (1989)** mediante la preincubación durante 2 horas en un medio sin sustrato (12,4%), si bien estos autores consiguen incrementar este porcentaje de células espermáticas vivas con acrosoma reaccionado hasta el 30% elevando la temperatura de preincubación a $+39,5^{\circ}\text{C}$ en un medio sin sustrato y en un tubo sellado.

Sin embargo, este incremento de células espermáticas vivas reaccionadas no se pone de manifiesto en el semen congelado (3,5%), debido principalmente a que el máximo de espermatozoides vivos que reaccionan de forma espontánea se da inmediatamente tras la descongelación, siendo el total de espermatozoos VR tras la inducción del 15%. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por **Pérez et al. (1996)** en semen de morueco, ya que dichos autores observan un aumento significativo del porcentaje de células reaccionadas inducidas en las dosis sometidas a procesos de congelación-descongelación en torno al 5% frente al fresco (utilizando en ambos casos el Ca^{2+} ionóforo como inductor de la reacción acrosónica), siendo los cambios estructurales y/o funcionales producidos en el espermatozoide debidos a los procesos de congelación y descongelación serían los responsables del aumento de la reacción acrosómica en las células espermáticas (**Pérez et al., 1996**). Sin embargo la utilización de la CTC como técnica de detección del estado acrosomal impide la observación de la

viabilidad de dichos espermatozoides.. No obstante, otros autores observan un aumento de la reacción acrosómica inducida en semen fresco superior al encontrado en dosis congeladas (Aravindakshan y Shorna, 1995). Whitfield y Parkinson (1995) obtienen en semen congelado de toro una alta correlación entre el incremento de la reacción acrosómica en dichas dosis y la tasa de preñez, siendo considerada como una prueba de alto valor predictivo no sólo en toro sino también en semen humano (Cummins et al., 1991).

El tiempo de preincubación previo a la adición del ionóforo no condicionaría según Cummins et al. (1991) el aumento o disminución de la respuesta máxima de reacción acrosómica. Sin embargo, Anand et al. (1989) observan en semen caprino diferencias significativas en el porcentaje de células espermáticas reaccionadas en función del tiempo previo de preincubación, llegando a alcanzar el 80% de espermatozoides reaccionados. Este alto porcentaje ha sido obtenido tras la inducción con Ca^{2+} ionóforo (10 mM/10 minutos) después de 4 horas de incubación en condiciones ambientales de capacitación, no especificando en ningún momento que tanto por ciento de espermatozoides vivos y/o muertos reaccionados han sido encontrados, por lo que teniendo en cuenta esta peculiaridad, nuestros resultados (con tan sólo una hora de capacitación) serían ligeramente inferiores a los de estos autores, mostrando entre un 60 -70% de espermatozoides reaccionados en los tres tipos de tratamientos seminales realizados. De este estudio se puede deducir que los mecanismos implicados en la reacción acrosómica son funcionales en los espermatozoides no capacitados, ya que la utilización de agonistas (como el calcio inóforo A23187) son capaces de inducir la respuesta máxima sin necesidad de un período largo de preincubación, estando nuestros resultados de acuerdo con Bielfed et al. (1994).

El aumento del porcentaje de células espermáticas muertas observado en esta

experiencia tras la incorporación del ionóforo es debido al influjo neto de Ca^{2+} hacia el interior del espermatozoide así como al efecto citotóxico de dicho inductor, acelerando los procesos degenerativos de la membrana y la posterior muerte celular, corroborando los trabajos de **Cummins (1994)** y **Carrell et al. (1996)**.

Los datos obtenidos a partir de la inducción del semen caprino mediante Ca^{2+} ionóforo apoyan los resultados encontrados en la experiencia 5.1., reafirmando el paso de parte de la población de espermatozoides vivos con acrosoma a vivos sin acrosoma antes de que su muerte celular tenga lugar. El descenso observado en la proporción de espermatozoides vivos con acrosoma es consecuencia del aumento simultáneo de la población de espermatozoides vivos con acrosoma y muertos sin acrosoma, experimentando la proporción de células espermáticas muertas con acrosoma un ligero incremento.

No hemos observado en ningún caso efectos negativos sobre la reacción acrosómica en las muestras controles adicionadas con DMSO, estando de acuerdo con los estudios de **Cummins et al. (1991)** y **Tesarik et al. (1993)**. No obstante, el porcentaje total de espermatozoides VR observado en cualquiera de los tratamientos seminales realizados (fresco, refrigerado y congelado) no alcanzan en ningún caso el total de células espermáticas capaces de sufrir las reacción acrosómica de manera espontánea. Este hecho es indicativo de una acción limitada del calcio ionóforo (a una concentración final de $1\mu\text{M}$) sobre la inducción de la reacción acrosómica en semen caprino o al excesivo tiempo requerido por la triple tinción hasta el momento de la fijación de la muestra. La presencia de albúmina en el medio de incubación podría reducir el porcentaje de espermatozoides reaccionados (**Aitken et al., 1984; Bielfeld et al; 1994**), sin embargo la baja concentración utilizada en nuestro estudio reduce la posibilidad de dicho efecto.

5.3. FECUNDACIÓN “IN VITRO” CON SEMEN CAPRINO CAPACITADO. CORRELACIÓN CON OTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.

El escaso valor predictivo que presentan las pruebas rutinarias de contrastación seminal sobre la fertilidad, han llevado al desarrollo en los últimos años de sistemas de fecundación “in vitro” con el fin de determinar del poder fecundante de un eyaculado. Estas metodologías son actualmente utilizadas para la evaluación de la reacción acrosómica, efectos de un tratamiento, estudios de maduración espermática en el epidídimo, efecto de anticuerpos sobre la fusión gamética así como para el estudio cromosómico de los espermatozoides (Vigil y Leonntic, 1986). Dentro del amplio marco de metodologías de FIV, el test de hamster ampliamente utilizado debido, principalmente, a la facilidad de obtención de un gran número de ovocitos así como a la sencillez de su manejo, pudiendo ser utilizado para la determinación de la capacidad fecundante de un eyaculado en muchas especies animales (Graham y Foote, 1987; Berger y Parker, 1989; Choudhry et al., 1995).

Los resultados encontrados en nuestro estudio demuestran la influencia del tratamiento seminal realizado sobre el porcentaje de penetración en ovocitos de hamster, observándose una aceleración en el tiempo del máximo de fertilidad del semen refrigerado y congelado frente al fresco similar al observado en el porcentaje de células espermáticas vivas reaccionadas. Este desplazamiento es indicativo del efecto capacitante de la conservación espermática (temperatura y diluyentes), mucho mas acusada en las muestras sometidas a congelación.

Nuestro estudio muestra la importancia que la preincubación espermática tiene sobre la fertilidad, siendo necesaria una incubación de 6 horas para la obtención del máximo de penetración espermática en semen fresco, de 3 horas en el refrigerado e

inmediatamente tras su descongelación en el congelado. Sin embargo, nuestros resultados no están de acuerdo con **Choudhry et al. (1995)**, observando estos autores un mayor porcentaje de penetración tras la preincubación durante 5 horas de muestras espermáticas procedentes de dosis descongeladas de morueco. Sin embargo, **Park y Sirard (1996)** en semen porcino y **Garde (1992 b)** en morueco observan un descenso en el porcentaje de penetración tras largos periodos de preincubación, observando su máximo a las 0 horas de la descongelación de las diferentes dosis, apoyando nuestras observaciones en semen de macho cabrío.

De todas las pruebas laboratoriales realizadas en el primer experimento, es el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado el que presenta unas tasas de correlación mayores con el porcentaje de penetración en ovocitos de hamster (F: $r = 0.95$; R: $r = 0.90$ y C: $r = 0.96$), siendo además la única prueba diagnóstica que se repite en los tres casos estudiados. El resto de las variables observadas no presentan correlaciones con el porcentaje de penetración en el semen fresco y refrigerado y sí con el congelado, pudiendo indicar una mayor sensibilización de los espermatozoides sometidos al proceso de congelación-descongelación a los procesos de capacitación. Sin embargo, otros investigadores han observado la existencia de correlaciones positivas entre la concentración de espermatozoides móviles y el porcentaje de penetración (**Choudhry et al.; 1995**); entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto y el número de espermatozoides observado por ovocito (**Bousquet et al., 1982**); y la prueba de endósmosis y el porcentaje de penetración de ovocitos de hamster (**Garde, 1992 b**), pero no establecen dicha correlación con la tasa de fertilidad "in vivo" (**Choudhry et al.; 1995**). **Berger y Parker (1989)** por el contrario, no observan ninguna correlación entre el porcentaje de morfoanomalías o la reacción acrosómica y la fertilidad, apoyando **Coetzee et al. (1994)** dichos trabajos.

El índice de penetración parece no seguir un patrón común entre los diferentes tratamientos realizados, observándose un mayor número de cabezas espermáticas por ovocito en las primeras horas de capacitación, siendo los valores encontrados inferiores a los obtenidos por **Hanada (1985)**. No se observa un patrón común en la correlación existente entre el IP con las diferentes variables analizadas en los diferentes tratamientos seminales.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1.- Los diferentes diluyentes empleados en la conservación espermática así como la centrifugación previa de las muestras seminales no influyen de manera diferencial sobre los distintos parámetros espermáticos observados durante el período de capacitación.

2.- Los procesos de conservación espermática condicionan una capacitación y reacción acrosómica prematura, así como un efecto negativo en el tiempo sobre el resto de los parámetros estudiados (a excepción de la endósmosis positiva en la refrigeración), siendo mas acusados en el proceso de criopreservación.

3.- La utilización del calcio ionóforo ($1\ \mu\text{M}$) como inductor de la reacción acrosómica es capaz de incrementar el porcentaje de espermatozoides reaccionados sin necesidad de una capacitación previa en parte de la población espermática, siendo su efecto similar en el semen fresco y refrigerado y prácticamente nulo en el descongelado.

4.- El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado se presenta como la única prueba laboratorial en semen caprino correlacionada con el porcentaje de penetración en ovocitos de hamster en todos los tratamientos seminales realizados.

5.- Los procesos de congelación-descongelación sensibilizan al espermatozoide en forma detectable por todas las pruebas diagnósticas excepto el porcentaje de células espermáticas muertas con acrosoma.

7. RESUMEN

7. RESUMEN

Las implicaciones económicas derivadas del desarrollo de la ganadería han generado un aumento de los estudios sobre fisiología reproductiva, sobre todo en el ganado bovino y porcino. Aunque no existen muchos trabajos realizados en el ganado caprino, esta especie está adquiriendo cada vez más importancia debido a su rusticidad, bajo coste de mantenimiento y su productividad lechera, por cuanto sería muy importante poder seleccionar los mejores reproductores.

Debido al papel decisivo que juega la capacitación espermática en los procesos de fertilización y al escaso conocimiento que se tiene sobre dichos procesos fisiológicos en el ganado caprino, se plantearon los siguientes objetivos: 1.- Determinar el perfil de capacitación y reacción acrosómica en el semen caprino; 2.- Comprobar la influencia de los procesos de refrigeración y congelación en dicho perfil; 3.- Estudiar la influencia de la inducción de la reacción acrosómica con el ionóforo de calcio en los procesos de conservación espermática y 4.- Establecer la relación existente entre todos los parámetros estudiados y la capacidad fertilizadora de un eyaculado.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio reflejan una escasa influencia de los diluyentes de conservación empleados y de la centrifugación previa de las muestras sobre la fisiología espermática durante la preincubación, siendo los procesos de refrigeración y congelación espermáticos los que condicionan una capacitación y reacción acrosómica prematura (demostrándose con el aumento previo de espermatozoides vivos reaccionados), así como un efecto negativo en el tiempo de los parámetros estudiados. Estas reacciones son mas acusadas en los procesos de criopreservación.

La inducción de la reacción acrosómica mediante la adición de ionóforo de calcio es capaz de incrementar el porcentaje de células espermáticas reaccionas en todos los tratamientos.

Con el fin de correlacionar los parámetros estudiados durante el periodo de capacitación con la fertilidad de un eyaculado se empleó el test de hamster, comprobándose la existencia de una correlación entre el porcentaje de penetración en ovocitos de hamster y el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado.

Los procesos de preservación, y sobre todo la congelación y descongelación espermática, sensibilizan al espermatozoide de forma detectable en todas las pruebas diagnósticas realizadas. Por otra parte, la comprobación del porcentaje de espermatozoides vivos que sufren reacción acrosómica de forma espontánea a lo largo del tiempo es el test que puede ayudarnos, con mayor fiabilidad dentro de las pruebas de laboratorio, a poder conocer la fertilidad de un eyaculado caprino, y por lo tanto, colaborar con la selección de los machos reproductores adecuados.

7.1. SUMMARY

The economic impact that results from agricultural development, has lead to a growing interest in studies of reproductive physiology, in particular in bovine and porcine species. Although there are not so many of these studies involving goats, its adaptation to the enviroment, low cost, and milk production in this species is now reaching great importance, and hence selection for best progenitors would be essential.

Due to the relevance of sperm capacitation on fertilization, and also due to the scarce data available about this process in goats, the following aims were proposed: 1.- To determine the profile of capacitation and acrosome reaction in goat semen; 2.- To test the influence of sperm refrigeration and freezing on these process; 3.- To study the influence of induced acrosome reaction with calcium ionophore on the preserved sperm cells; and 4.- To establish correlations among all the studied parameters and the fertilizing capacity of an ejaculated.

The results obtained in our study show a small influence of the diluents used for conservation and the centrifugation of the semen samples on the sperm physiology during the preincubation. Sperm freezing and refrigeration are the processes with most influence on the timing on premature capacitation and acrosome reaction (which is demostrated with an increase of alive spermatozoa reacted). A negative effect on the timing of the parameters studied is show. These effects are specially marked when the process implies cryopreservation.

The acrosome reaction induced with calcium ionophore is able to increase the percentaje of reacted cells in all the treatments.

In order to establish correlations between all the parameters studied during capacitation and fertilizing capacity of an ejaculate, the sperm penetration assay was used. A correlation was found between the percentaje of hamster oocytes penetrated and

the percentage of alive spermatozoa with acrosome reacted.

The processes of preservation in general, and the sperm freezing-thawing in particular, sensitize the sperm cell in a significant way in all the test performed without decreasing the fertilizing ability of the cryopreserved sperm doses. By the same talking, testing the percentage of alive spermatozoa spontaneously reacted across time is the method of choice among all the laboratory tests to know the fertilizing capacity of a goat ejaculate and therefore to promote selection of the appropriate male progenitors.

8. ABREVIATURAS

8. ABREVIATURAS

AAT	Aspartato Amino Transferasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
AMP-c	Adenosin-monofosfato cíclico
ARIC	Test de inducción de la reacción acrosómica
B	Tratamiento de conservación espermática: diluyente BesKOH/sin centrifugar
BC	Tratamiento de conservación espermática: diluyente BesKOH/centrifugado
BES	Ácido N,N-bis (2-hidroxietil)-2-animoetanosulfónico
BSA	Albúmina sérica bovina
BWW	Medio de cultivo de Biggers, Whitten y Whittingham
C	Semen congelado
CASA	Analizador de imágenes asistido por ordenador
CM	Calidad de movimiento
Con A	Canavalia ensiformis
CTC	Clorotetraciclina
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
E+	Endósmosis positiva
EM	Espermatozoides móviles
F	Semen fresco
FD	Factores de decapitación
FIV	Fecundación "in vitro"
G	Glicerol
HA	Hiperactivación
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEPES	Ácido hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IA	Inseminación Artificial
ICSI	Microinyección espermática

IP	Índice de penetración de ovocitos de hamster
IU	Inseminación intrautero
LFC	Lisofosfatidil-colina
LIN	Rectitud de la trayectoria curvilínea
MA	Espermatozoides muertos con acrosoma
MI	Movilidad individual
MM	Movilidad masal
MPA	Maclura pomífera
MR	Espermatozoides muertos reaccionados
NAR	Espermatozoides con borde apical normal
N ₂ L	Nitrógeno Líquido
PIPES	Ácido piperazina-N,N'-bis (2-etanosulfónico)
PN	Pronúcleos
PNA	Arachis hypoganea
PO	Presión osmótica
PP	Porcentaje de penetración de ovocitos de hamster
PSA	Pisum Sativum
R	Semen refrigerado
RA	Reacción acrosómica
SBA	Glycine max.
STR	Rectitud de la trayectoria media
T	Tratamiento de conservación espermática: diluyente TFC / sin centrifugar
TC	Tratamiento de conservación espermática: diluyente TFC / centrifugado
TE	Transferencia de embriones
TES	Ácido N-Tris(Hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
TFC	Diluyente de conservación de semen: Tris-Fructosa-Cítrico
TH	Test de hamster
TRIS	Tris (Hidroximetil)metil-2-aminoetano
VA	Espermatozoides vivos con acrosoma
VAP	Velocidad de la trayectoria media

VCL	Velocidad curvilínea
VR	Espermatozoides vivos reaccionados
VSL	Velocidad rectilínea
WGA	Triticum vulgaris
YH	Yema de huevo
ZP	Zona pelúcida

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

ABDELHAKEM A.A., GRAHAM E.F., VÁZQUEZ I. & CHALONER K.M. (1991) "Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen". Cryobiology, 28: 43-49.

ABRAHAM A. & AGRANZ G. (1987) "Caprinotecnia". Ed. Limusa, S.A. Vol.II., 1571-1665.

ADENOYA-OSIGUWA, S. & FRASER, L. (1996) "Evidence for Ca^{2+} - dependent ATP-asa activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm". Mol. Reprod. Develop., 44:11-120.

AGUADO M.J., GARDE J., PÉREZ-GUZMAN M.D., MONTORO V. Y VÁZQUEZ I. (1994) "Variaciones estacionales de la criorresistencia del semen de morueco manchego". XIX J. Científicas S.E.O.C., Burgos (España): 507-509.

AGUADO M.J., MADRIDANO J.M., GRACIA O., GALLEGO R., AYLLÓN E. y GARDE J.J. (1994) b) "Determinación simultánea del estado del acrosoma y de la viabilidad espermática en el semen de ciervo mediante el empleo de una técnica de triple tinción". 7ª J. Int. Reprod. Anim., Murcia (España): 261-269.

AITKEN R.J., WANG Y.F., LUI J., BEST F. & RICHARDSON D.W. (1983) "The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa; development of an improved zona-free hamster egg penetration test". Int. J. Androl., 6: 180-189.

AITKEN R.J., ROSS A., HARGREAVE T., RICHARDSON D. & BEST F. (1984) "Analysis of human function following exposure to the ionophore A23187". J. Androl., 5: 321-329.

AITKEN R.J. (1990) "Evaluation of human sperm function". British Medical Bulletin, 46 (3): 654-674.

AL-HASANI S., ALPÜSTÜN S., LUDWIG M., DIEDRICH K., BAUER O., KÜPKER, WOLFF & KREBS D. (1996) "The combination of two semen preparation techniques (glass wool filtration and swim-up) and their effect on the morphology of recovered spermatozoa and outcome of IVF-ET". Int. J. Androl., 19: 55-60.

ALVAREZ J., LASSO J., BLASCO L., NÚÑEZ R., HEYNER S., CABALLERO P & STOREY B. (1993) "Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime". Human Reprod., 8 (7): 1087-1092.

AMIN A-H., BAILEY J.L., STOREY B.T., BLASCO L. & HEYNER S. (1996) "A comparison of three methods for detecting the acrosome reaction in human spermatozoa". Human Reprod., 11 (4): 741-745.

AMOAH E.A. & GELAYE S. (1997) "Biotechnological advances in goat reproduction". J. Anim. Sci., 75: 578-585.

ANAND, S.R., ATREJA, S.K., CHAUHAN, M.S. & RATNESH BEHL (1989) "In vitro capacitation of goat spermatozoa". Indian J. Experimental Biol., 27: 921-924.

ANDERSON R.A., REDDY J.M., OSWALD C. & ZANEVELD L.J.D. (1979) "Enzymatic determination of fructose in seminal plasma by initial rate analysis". Clin. Chem., 25: 1780-1782.

- ANDOLZ P. y BIELSA M.A. (1995) "Semen humano. Manual y atlas". Ed. Garsi, S.A.: 168p.
- ANEL L.(1994 a) "Situación actual de la inseminación artificial ovina en España" 7ª J. Int. Reprod. Anim., Murcia (España): 261-269.
- ANEL L.(1994 b) "Estudio sobre la influencia de la yema de huevo en los diluyentes espermáticos para semen refrigerado (15°C) de morueco". 7ª J. Int. Reprod. Anim., Murcia (España): 261-269.
- ANZAR M. & GRAHAM E.F. (1996) "Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen". Theriogenology 45: 513-520.
- ARAVINDAKSHAN T.V. & SHARMA A. (1995) "Induction of acrosome reaction in fresh and frozen-thawed bovine spermatozoa by platelet activating factor". Indian J. Exp. Biol., 33 (2): 87-90.
- ARMSTRONG D.T. & EVANS G. (1984) "Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes". J. Reprod. Fert., 71: 89-94.
- AUSTIN, C.R. (1952) "The "capacitation" of the mammalian sperm". Nature, Lond., 170: 326.
- AUSTIN J.W., LEIDY R.B., KRISSE G.M. & HUPP E.W. (1968) "Normal values for semen collected from spanish goats by two methods". J. Appl. Physiol., 24: 369-372.
- AVERY B. & GREVE T. (1995) "Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination". Theriogenology, 44: 871-878.
- ÁVILA M.J., SORIA J., AGUILERA A., GONZÁLEZ GILL y LÓPEZ RODAS V. (1993) "Utilización de técnicas de swim-up en la mejora del semen de ganado vacuno". Arch. Zootec., 42: 229-236.
- AZAWI O.J., AL-DAHASH S.Y.A. & JUMA F.T. (1993) "Effect of different diluents on shami goat semen". Small Ruminant Research, 9 : 347-352.
- BALAKRISHNAN P.P. & NEELAKANTA C.P. (1982) "Preservation of buck semen at room temperature in coconut milk extender". Kerala J. Vet. Sci., 13 (2): 321-324.
- BALL B.A. & MOHAMMED H.O. (1995) "Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis". Theriogenology, 44: 367-377.
- BALL G.D., LEIBFRIED M.L., LENZ R.W., AX R.L., BAVISTER B.D. & FIRST N.L. (1983) "Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes". Biol. Reprod., 28: 717-725.
- BARKER C.A.V. (1958) "The collection of semen from bulls, rams and bucks by electro-eyaculator". Can. J. Comp. Med., 22: 3-8.
- BAWA S.R., PABST M.A., WERNER G. & BAINS H.K. (1992) "Capacitated and acrosome reacted spermatozoa of goat (*Capra indicus*): a fluorescence and electron microscopic study". Andrologia 25: 123-135.
- BEDFORD, J.M. & CHANG, M.C. (1962) "Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation". Am. J. Physiol., 202: 179-181.
- BERG D., HUNTER A. SINGH G. & GRAHAM E. (1990) "Frozen ram semen immediately post-thaw, can fertilize sheep oocytes". J. Anim. Sci., 68 suppl. (1): 459.

- BERGER T & HORTON M.B.(1988) "Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility". Gamete Research, 19: 101-111.
- BERGER T. (1989) "Development of a zona-free hamster ova bioassay for goat sperm". Theriogenology, 32 (1): 69-77.
- BERGER T. & PARKER K. (1989) "Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility". Gamete Research, 22: 385-397.
- BERGER T. (1990) "*Pisum Sativum* agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm". Theriogenology, 33 (3): 689-695.
- BERGER T., DROBNIS E.Z., FOLEY L., METZLER J.K. & HORTON M. (1994) "Evaluation of relative fertility of cryopreserved goat sperm". Theriogenology, 41: 711-717.
- BIELFELD P., JEYENDRAN R.S., HOLMGREN W.J. & ZANEVELD L.J.D. (1990) "Effect of yolk medium on the acrosome reaction of human spermatozoa". J. Androl., 11: 260-269.
- BIELFELD P., ANDERSON R.A., MARK S.R., DE JONGE C.J. & ZANEVELD L.J.D. (1994) "Are capacitation or calcium ion influx required for the human sperm acrosome reaction?". Fertil. Steril., 62 (6): 1255-1261.
- BIGGERS, J., WHITTEN, W. & WHITTINGHAM, D. (1971) "The culture of mouse embryos "in vitro" ". In: Methods in Mammalian embryology. Ed. Freeman and Co. San Francisco: 86-116.
- BLEIL J.D. & WASSARMAN P.M. (1983) "Sperm-egg interaction in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by zona pellucida glycoprotein". Development Biol., 95: 317-324.
- BOIXO J.C. (1994) "Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad". 7ª Jornada Int. Reprod. Animal. Murcia, (España): 61-69.
- BORQUE C., VÁZQUEZ I. & SIMARRO M. (1989) "Determinación espectrofotométrica de fructosa, ác. cítrico y proteínas totales en eyaculados de pequeños rumiantes". Forum Internacional sobre Reproducción Animal. Itsaslur, Bilbao (España): 141-146.
- BORQUE C. & AYLLÓN M.A. (1996) "Aspartate aminotransferase in ejaculates of Manchego and Merino rams after minimal and maximal sperm damage". Theriogenology, 26 (6): 1017-1025.
- BOUSQUET D. & BRACKETT B.C. (1982) "Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage". Theriogenology, 17: 199-213.
- BRACKETT P., BOUSQUET D., BOICE M., DONAWICH W., EVANS J. & DRESSEL M. (1982) "Normal development following in vitro fertilization in the cow". Biol. Reprod., 27: 147-158.
- BRADLEY M.P. & FORRESTER I.T. (1982) "Human and ram seminal plasma both contain a calcium-dependent regulator protein". J. Androl., 3: 289-296.
- BRUCKER C. & LIPFORD G.B. (1995) "The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms". Human Reprod. Update, 1 (1): 51-62.

- BURKMAN L.J. (1995) "The motility of human spermatozoa before and after capacitation" En: Gametes. The spermatozoon. Ed. Cambridge University Press: 122-139.
- CAMPOS I., GADEA J., MATAS C., VAZQUEZ J.M., MARTINEZ E. y ROCA J. (1994) "Evaluación del método colorimétrico para la determinación de la concentración espermática en eyaculados de la raza caprina Murciano-Granadina". 7ª Jornada Int. Reprod. Anim., Murcia(España): 112.
- CARBONERO D. (1954) "Técnicas de laboratorio". Ministerio de Agricultura. Dirección General de Ganadería: 9-12.
- CARBONERO D. y VÁZQUEZ I. (1984) "Congelación de semen de morueco. Conservación del acrosoma". Zootecnia, XXV: 30-42.
- CARRELL D.T. & URRY R.L. (1996) "Sperm penetration assay modifications for improved prediction of sperm fertilization capacity". Assisted Reprod. Reviews., 6 (4): 170-174.
- CASEY P.J., GRAVANCE C.G., DAVIS R.O., CHABOT D.D. & LIU I.K.M. (1997) "Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions". Theriogenology 47: 575-582.
- CENTOLA G.M., MATTOX J.H., BURDE S. & LEARY J.F. (1990) "Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy". Mol. Reprod. Dev., 27: 130-135.
- COETZEE K., OLMEDO J. & LOMBARD C.J. (1994) "Induced acrosome reactions as fertility predictor". J. Assist. Reprod. Genet., 11 (9): 470-473.
- COLAS G (1980) "Variations saisonnières de la qualité du sperma chez le bélier Ile-de -France.I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale". Reprod. Nutr. Dévelop., 20 (6): 1789-1799.
- COOPER T.A., WANG S., LIU Y., BUNCH T.D. & HOLYOAK G.R. (199) "A new method to evaluate the viability of cryopreserved ram semen using a resazurin reduction assay". Theriogenology :313.
- CORNETT L. & MEIZEL S. (1978) "Stimulation of in vitro activation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa by catecholamines". Proc. Natl. Acad. Sci., 75 (10): 4954-4958.
- CORREA J.R. & ZAVOS P.M. (1996 a) "Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies". Theriogenology,46: 1225-1232.
- CORREA J.R., RODRIGUEZ M.C., PATTERSON D.J. & ZAVOS P.M. (1996 b) "Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity". Theriogenology, 46: 413-420.
- CORTEEL J.M. (1975) "Effet du lavage sur la conservation des spermatozoïdes de bouc à basse température". Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 15: 525-571.
- CORTEEL J.M. (1976) "Variations de la motilité et de la fécondance des spermatozoïdes da bouc". Ann. Zootech., 25 (4): 567-571.
- CORTEEL J.M. (1980) "Effet du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro". Reprod. Nutr. Dévelop., 20: 1111-1123.

- CORTEEL J.M. (1981) "Collection, processing and artificial insemination of goat semen". En: Goat Production. Ed. Academic Press Inc. London: 171-191.
- CORTELL J.M. (1992) "Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation". V Int. Conf. On Goats, New Delhi (India): 290-297.
- CORTÉS S., NUÑEZ R. y VÁZQUEZ I. (1993) "Capacidad de reacción del espermatozoide de macho cabrío a la prueba de la endósmosis". 5º Simposium Internacional Reproducción Animal, Luso. (Portugal), Vol. II: 225-230.
- CORTÉS S., SORIA V., VÁZQUEZ I. y NUÑEZ R. (1994a) "Evaluación de la reacción acrosómica en semen ovino utilizando el anticuerpo monoclonal, GB24, y el HOS test". XIX Jornadas Científicas de la S.E.O.C., Burgos (España): 536-541.
- CORTÉS S., SORIA V., PÉREZ B. y URQUIA J.J. (1994b) "Calidad seminal en machos cabríos de la raza del Guadarrama. Estudio comparativo". XIX Jornadas Científicas de la S.E.O.C., Burgos (España): 532-535.
- CORTÉS S., MONTERO N., TOMÉ A y VÁZQUEZ I. (1995) "Viabilidad espermática de semen ovino durante 48 horas". VI Jornadas sobre Producción Animal, Vol. Extra, 16 -Tomo I, ITEA : 422-424.
- CORTÉS S., SANTIAGO J. y GONZALEZ DE BULNES A. (1996) "Recogida de semen de muflón". Trofeo, 317: 34-36.
- COURTENS J.L., NUNES J.F. & CORTEEL J.M. (1984) "Induction of the acrosome reaction in the spermatozoa of the goat by secretions of the male accessory glands and milk". Gamete Research, 9: 287-302.
- COX J.F., SARAU F., BRIONES M & SANTA MARÍA A. (1995) "Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa". Theriogenology, 44: 451-460.
- CROSS N.L. (1996) "Effect of cholesterol and sterol on human sperm acrosomal responsiveness". Mol. Reprod. Dev., 45: 212-217.
- CROZET N. & DUMONT M. (1984) "The site of the acrosome reaction during in vivo penetration of the sheep oocyte". Gamete Res., 10: 97-102.
- CROZET N., HUNEAU D., DESMEDT V., THÉRON M.C., SZÖLLÖSI D., TORRÈS S. & SÉVELLEC C. (1987) "In vitro fertilization with normal development in the sheep". Gamete Research, 16: 159-170.
- CROZET N. (1988) "Fine structure of sheep fertilization in vitro". Gamete Res., 19: 291.
- CROZET N., AHMED-ALI M. & DUBOS M.P. (1995) "Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro". J. Reprod. Fertil., 103: 293-298.
- CUENCA SÁNCHEZ A. (1982) "Mejora y selección del ganado caprino". En "Manual sobre cabras". Ed. Extensión Agraria: 29-39.
- CUMMINS J.M. & YANAGIMACHI R. (1982) "Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster". Gamete Research, 5: 239-256.

- CUMMINS J.M., PEMBER S.M., JEQUIER A.M., YOVICH J.L. & HARTMANN P.E. (1991) "A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge". J. Androl., 12 (2): 98-103.
- CUMMINS J.M. (1994) "Diagnostic use and techniques of acrosome reaction evaluation". In: Male factor in Human Infertility. Ares-Serono Symposia Series. Frontiers in Endocrinology, 8: 101-153.
- CUMMINS, J.M. (1995) "Test of sperm function". In: "The Gametes: The spermatozoon". Ed. Cambridge University Press: 70-103.
- CURRY, M.R. & WATSON, P.F. (1995) "Sperm structure and function". In: "Gametes - The spermatozoon". Grudzinskas, J.G. y Yovisch, J.L. Ed. Cambridge University Press.: 45-69.
- CHAND D., LOHCHUBA B.S. & ARORA K.L. (1985) "Biochemical constituents of semen in Nali and Lohi breeds of rams". Indian Vet. J., 62: 964-968.
- CHANG M.C. (1951) "Fertilization capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes". Nature, 168: 997-998.
- CHANG M.C. (1984) "The meaning of sperm capacitation. A historical perspective". J. Androl., 5: 45-50.
- CHAUHAN M.S. & ANAND S.R. (1990) "Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen". Theriogenology, 34 (5) :1003-1013.
- CHAUHAN M.S., KAPILA R., GANDHI K.K. & ANAND S.R. (1994) "Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing". Andrologia 26: 21-26.
- CHINYOY N.J., RANGA G.M., HIGHLAND H.N., D'SOUZA K.J. & SEQUEIRA E. (1992) "A modified method for the differential staining of spermatozoa using alcoholic acidic silver nitrate". Int. J. Fertil., 37 (4): 232-236.
- CHOUDRY T.M., BERGER T. & DALLY M. (1995) "In vitro fertility evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative in vivo fertility". Theriogenology, 43: 1195-1200.
- DARIN-BENNETT A. & WHITE I.G. (1977) "Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock". Cryobiology 14: 466-470.
- DARNELL, J., LODISH, H. & BALTIMORE, D. (1988) "Biología celular y molecular". Ed. Labor, S.A.:567-615.
- DAVIS, B.K., BYRNE, R. & BEDIGIAN, K. (1980) "Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 1546-1550.
- DEKA B.C. & RAO A.R. (1985 a) "Effect of glicerol and DMSO on sperm motility in frozen buck semen". Ind. J. Anim. Sci., 6 (2): 95-96.
- DEKA B.C. & RAO A.R. (1985 b) "Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen buck semen". Ind. Vet. J., 62: 414-417.
- DEKA B.C. & RAO A.R. (1985 c) "Effect of extenders on freezability of buck semen". Ind. J. Anim. Sci., 55 (12): 1035-1040.

- DEKA B.C. & RAO A.R. (1986) "Effect of glycerol level in tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen". Theriogenology, 26 (2): 231-238.
- DELGADILLO J.A., LEBOEUF B. & CHEMINEAU P. (1991) "Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles". Theriogenology, 36 (5): 755-770.
- DELGADILLO J.A., LEBOEUF B. & CHEMINEAU P. (1992) "Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks". Small Ruminant Research, 9: 47-59.
- DELL'AQUILA M.E., CHO Y.S., MINOIA P., TRAINA V., FUSCO S., LACALANDRA G.M. & MARITATO F. (1997) "Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir and in vitro-matured equine oocytes". Theriogenology, 47: 1139-1156.
- DERIVAUX (1982) "Reproducción de los animales domésticos". Ed. Acriba. Zaragoza (España): 537p.
- DE SMEDT V., CROZET N., AHMED-ALI M. & COGNIE Y. (1992) "In vitro maturation and fertilization of goat oocytes". Theriogenology, 37: 1049-1060.
- DIDION B.A. & GRAVES C.N. (1986) "In vitro capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows". J. Anim. Sci., 62: 1029-1033.
- DOBROINSKI I., SMITH T.T., SUAREZ S.S. & BALL B.A. (1997) "Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro". Biol. Reprod., 56: 861-869.
- DONOGHUE A.M., GARNER D.I., DONOGHUE D.J. & JOHNSON L.A. (1996) "Assessment of the membrane integrity of fresh and stored turkey spermatozoa using a combination of hypo-osmotic stress, fluorescent staining and flow cytometry". Theriogenology, 46: 153-163.
- DUNNER S. (1991) "Utilización de productos zwitterionicos en la dilución, refrigeración y congelación del semen de macho cabrio". Tesis Doctoral, UCM (España): 189 p.
- ECKERT R., RANDALL D. & AUGUSTINE G. (1989) "Fisiología animal". Ed. McGraw-Hill-Interamericana.: 65-100.
- ELHASSAN Y.M. & WRIGHT R.W. (1995) "The effect of selenium and vitamin E addition on cleavage rate of IVM/IVF bovine oocytes". Theriogenology, 43 (1): 206.
- EMILIOZZI C., CORDONIER H., GUÉRIN J.F., CIAPA B., BENCHAIÏB M. & FÉNICHEL P. (1996) "Effects of progesterone on human spermatozoa prepared for in-vitro fertilization". Int. J. Androl., 19: 39-47.
- EVANS, R. W., WEAVER, D.E. y CLEGG, E.D. (1980) "Diacyl, alkenyl, and alkyl ether phospholipids in ejaculated, in utero, and in vitro-incubated porcine spermatozoa". J. Lipid Res., 21: 223-228.
- FAWCETT D.W. (1975) "The mammalian spermatozoan". Devol. Biol. 44: 394-439.
- FAYRER-HOSKEN, R.A., BRACKETT, B.G. & BROWN, J. (1987) "Reversible inhibition of rabbit sperm fertilizing ability by cholesterol sulfate". Biol. Reprod., 36: 878-883.

FÉNICHÉL P., HSI B.L., FARAHIFAR D., DONZEAU M., BARRIER-DELPECH D. & YEH C.J.G. (1989) "Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter". J. Reprod. Fert., 87: 699-706.

FERNÁNDEZ J.L., COSTAS E. & GOYANES V.J. (1990) "Chromosome structure and condensation in relation to DNA integrity". Cytobios., 63: 193-204.

FISER P.S., AINSWORTH L. & LANGFORD G.A. (1981) "Effect of osmolarity of skim milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa". Cryobiology, 18: 399-403.

FLORMAN H.M. & STOREY B.T. (1982) "Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro". Develop. Biol., 91: 121-130.

FOURNIER-DELPECH & THIBAUT, C. (1993) "Reproduction in mammals and man". Ed. Ellipses, Cap. 14: 257-279.

FOXCROFT G.R., XU X., SETH P.C., HARRISON D.S. & CHEUNG A.P. (1995) "Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig and IVF systems". Theriogenology, 43 (1): 212.

FRASER, L.R. (1983) "Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro". J. Reprod. Fert., 69: 539-553.

FRASER, L.R. (1987) "Minimum and maximum extracellular Ca^{++} requirement during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro". J. Reprod. Fert., 81: 77-89.

FRASER, L.R. , HARRISON, R.A.P. & HEROD, J.E. (1990) "Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa". J. Reprod. Fert., 89: 135-148.

FRASER, L.R. & McDERMOTT, C.A. (1992) " Ca^{++} -related changes in the mouse sperm capacitation stage: a possible role for Ca^{++} -ATPase". J. Reprod. Fert., 96:363-377.

FRASER, L.R. (1994) "Sperm functional Changes from ejaculation to fertilization". Ares-Serona Symp. Public., 8: 46-66.

FRASER, L.R., ABEYDEERA, L.R. & NIWA K. (1995) " Ca^{++} -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis". Molec. Reprod. Developm., 40: 233-241.

FUSE H., KAZAMA T. & KATAYAMA T. (1991) "Relationship between hypoosmotic swelling test, semen analysis and zona-free hamster ovum test". Arch. Androl., 27: 73-78.

FUSI, F.M., TAMBURINI, C., MANGILI, F., MONTESANO, M., FERRARI, A. & BRONSON, R.A. (1996) "The expression of α_v , α_5 , β_1 , and β_3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies their functional state". Molec. Human Reprod., 2 (3): 169-175.

GAFO, C. (1992) "Respuesta del espermatozoide de conejo a la prueba de la endósmosis y su relación con otros parámetros de valoración seminal". Tesina. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid: 105p.

GAMZU R., YAVETZ H., LICHTENBERG D., PAZ G., HOMONNAI Z.T. y YOGEV L. (1994) "The effect of egg yolk on the binding capacity of human spermatozoa to zona pellucida". Fertil. Steril., 62 (6): 1221-1225.

- GARCÍA ARTIGA C. (1992) "Viabilidad del semen congelado de morueco". Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia (España): 134p.
- GARCÍA ARTIGA C., VÁZQUEZ I., GARDE J. y MARTINEZ E. (1993) "Estudio "in vitro" de la viabilidad del semen congelado de morueco". Invest. Agr.: Prod. Sanid. An., 8 (1): 33-43.
- GARCIA ARTIGA C., GARDE J.J., PÉREZ FUENTES J., MARTINEZ E. y VÁZQUEZ I. (1994) "Correlaciones entre distintos parámetros utilizados a nivel de laboratorio para determinar la calidad del semen de morueco. 7ª J. Int. Reprod. An., Murcia (España): 116.
- GARCÍA-LÓPEZ N., OLLERO M., MUIÑO-BLANCO T. & CEBRIÁN-PÉREZ J.A. (1996) "A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma". Theriogenology, 46: 141-151.
- GARCÍA-SOTO, J., MOURELLE, M., VARGAS, I., DE LA TORRE, L., RAMIREZ, E., LOPEZ-COLOMÉ, A.M., & DARSZON, A. (1988) "Sea urchin sperm head plasma membranes: characteristics and egg jelly induced Ca^{2+} and Na^{+} uptake". Biochim. Biophys. Acta, 944: 1-12.
- GARDE J.J., Gª ARTIGA C., GUTIERREZ A. y VAZQUEZ I. (1992 a) "Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. Med. Vet., 9: 107-114.
- GARDE J.J. (1992 b) "Congelación de semen en la especie ovina: Características biológicas de las dosis descongeladas". Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de La U.C.M. (España): 137.
- GARDE J.J., PÉREZ S.S., AGUADO M.J., GARRIDO D., AYLLÓN E., MONTORO V. y DÍAZ J.D. (1994) "Evolución postmortem de la viabilidad y de la capacidad fecundante del semen de ciervo y de muflón". XIX J. Científicas S.E.O.C., Burgos (España): 542-545.
- GARDE J.J., AGUADO M.J., PÉREZ S., GARRIDO D. y VÁZQUEZ I. (1995) "Tecnología para la conservación del semen de morueco". Ovis, 36: 37-48.
- GARDE J.J., GARCIA A.J., ORTIZ N y GALLEG0 L. (1996) "Evaluación de espermatozoides obtenidos "post-mortem" en el ciervo". 1ª Jornada sobre Biología y Patología de la Reproducción Masculina., Madrid (España).
- GINSBURG K.A., SACCO A.G., MOGHISSI K.S. & SOROVETZ S. (1989) "Variation of movement characteristics with washing and capacitation of spermatozoa.I. Univariate statistical analysis and detection of sperm hyperactivation". Fertil. Steril., 51(5): 869-873.
- GO, K.J. & WOLF, D.P. (1985) "Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation". Biol. Reprod., 32: 145-153.
- GÓMEZ E., IRVINE S & AITKEN J (1996 a) "Diagnóstico de la función espermática". En: Reproducción Humana. McGraw-Hill/Interamericana de España: 101-119.
- GÓMEZ E & PELLICER A. (1996 b) "Problems and solutions in sperm life events: Intracytoplasmic sperm injection- The final answer". Ass. Reprod. Rev., 6 (3): 108-115.
- GONZALES G.F. & VILLENA A. (1997) "Influence of low corrected seminal fructose levels on sperm chromatin stability in semen from men attending an infertility service". Fertil. Steril., 67 (4): 763-768.
- GOTO K., KINOSHITA A., TAKUMA Y & OGAWA K. (1990) "Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa". Vet. Res., 127: 517-520.

- GOTO K., TABATA S. & NAKANISHI Y. (1995) "Viability characteristic of killed bovine spermatozoa used for intracytoplasmic sperm injection". Theriogenology, 43 (1): 222.
- GOYAL R.L., TULI R.K., GEORGIE G.C. & CHAND D. (1996) "Comparison of quality and freezability of water buffalo semen after washing or sephadex filtration". Theriogenology, 46: 679-686.
- GRAHAM E.F., SCHMEHL M.K.L., EVENSEN B.K. & NELSON P.S. (1978 a) "Semen preservation in non-domestic mammals". Symp. Zool. Soc. Lond., 43: 153-173.
- GRAHAM E.F. (1978 b) "The integrity of frozen spermatozoa". National Academy of Sciences: 1-44.
- GRAHAM E.F. & FOOTE R.H. (1987) "Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm". Gamete Research, 16: 147-158.
- GRAVANCE C.G., LEWIS K.M. & CASEY P.J. (1995) "Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa". Theriogenology, 44: 989-1002.
- GREYLING J.P.C. & GROBBELAAR J.A.N. (1982) "Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goats rams using different collection techniques". S. Afr. J. Anim. Sci., 13 (4): 250-252.
- GRIVEAU J.F. & LE LANNOU D. (1994) "Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques". Int. J. Androl., 17: 225-231.
- GROSSMANN M., ARÁN B., VEIGA A. y SANTALÓ J. (1991) "Hamster test: Utilització d'òcits criopreservants". 2es Jornades de Biologia de la Reproducció, Barcelona.
- GUÉRIN Y (1990) "Méthodes de conservation de la semence ovine". Elevege & Insémination 236: 3-14.
- GUTIERREZ A., GARDE J., GARCIA-ARTIGA C. & VÁZQUEZ I. (1993) "Ram spermatozoa cocultured with epithelial cell monolayers: an in vitro model for the study of capacitation and the acrosome reaction". Molecular Reprod. Dev., 36: 338-345.
- HAFEZ E.S.E. (1984) "Reproducción e inseminación artificial en animales". Ed. Interamericana: 160-194.
- HAMAWAKI A., MAHANO S. & KUWAYAMA M. (1995) "Effect of methylated xanthine on sperm penetration of bovine oocytes matured in vitro". Theriogenology, 43 (1): 230.
- HAMMERSTEDT R.H. (1993) "Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of effect on design of storage preservation systems". Reprod. Fertil. Dev., 5: 675-690.
- HANADA A. (1985) "In vitro fertilization in goats". Jpn. J. Anim. Reprod., 31: 21-26.
- HARRINSON, R.A.P., ASHWORTH, P.J.C., MAIRET, B., MILLER, N.G.A., PLUMMER, J.M. & WATSON, P.F. (1994) "Variations between semen samples in the response of sperm populations to capacitating conditions". 7ª J. Int. Reprod. Anim., Murcia (España): 101-105.
- HAUSER R., YAVETZ H., PAZ G.F., HOMONNAI Z.T., AMIT A., LESSING J.B., PREYSEY M.R. & YOGEV L. (1992) "The predictive fertilization value of the hypoosmotic swelling test (HOST) for fresh and cryopreserved sperm". J. Assisted Reprod. Genet., 9(3): 265-270.

- HERRERA J., TAPIA A. y SUBIRES E. (1994) "Inseminación artificial con semen congelado en ganado caprino (raza Murciano-Granadina)." 7ª J. Int. Reprod. Anim., Murcia (España): 315.
- HERRERA J. y TAPIA A. (1995) "Estacionalidad en la producción seminal del macho cabrío de raza Murciano Granadina" XX Jornadas Científicas de la Sociedad Española De Ovinotecnia y Caprinotecnia, Madrid (España): 99-106.
- HOSHI K., SUGANO T, ENDO C, YOSHIMATSU N., YANAGIDA K & SATO A (1993) "Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by human zona pellucida and effect of cervical mucus on zona-induced acrosome reaction". Fertil. Steril., 60 (1): 149-153.
- HOSHI K., KATAYOSE H., YANAGIDA K., KIMURA Y. & SATO A. (1996) "The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm". Fertil. Steril., 66 (4): 634-639.
- HUNTER R.H.F., NICHOL, R. & CRABTREE, S.M. (1980) "Transfer of spermatozoa in the ewe: Timing of the establishment of a functional population in the oviductal". Reprod. Nutr. Dev., 20: 1869-1875.
- HUNTER R.H.F. (1982) "Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos". Ed. Acriba, Zaragoza (España): 362p.
- HUNTER, R.H.F. & WILMUT, I. (1984) "Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct". Reprod. Nutr. Dev., 24: 597-608.
- ICHIMURA, S., ZAMA, M. & FUJITA, H. (1971) "Quantitative determination of single-stranded sections in DNA using the fluorescent probe acridine orange". Biochem. Biophys. Acta., 240: 485-495.
- IRITANI A. & NISHIKAWA Y. (1962) "Studies on the egg-yolk coagulating factor (enzyme) in goat semen. III. Coagulation action to the fractionated yolk". Vet. Zootec., 17: 322-325.
- IRITANI A. & NISHIKAWA Y. (1964) "Studies on the egg-yolk-coagulating enzyme in goat semen. VI. On the chemical properties of the ejaculated semen, and the secretion of accessory sexual organs in the goat". Jap. J. An. Reprod., 10 (2): 44-51.
- IWAMATSU, T., y CHANG, M.C. (1971) "Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro". J. Reprod. Fertil., 26: 197-208.
- JASKO D.J., LITTEL T.V., SMITH K., LEIN D.H. & FOOTE R.H. (1988) "Objective analysis of stallion sperm motility". Theriogenology, 30 (6): 1159-1167.
- JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ M., GRABO, G. & ZANEVELD, L.J.D. (1984) "Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics". J. Reprod. Fert. 70: 219-228.
- JIMENEZ CABRAS M. (1995) "Caracterización de espermatozoides de toro por medio de: 1) swim-up; 2) lectinas; 3) anticuerpos y 4) test de Fucus". Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. U.C.M.: 100p.
- JIMENEZ MUÑOZ T., FERNANDEZ-PACHECO E., JIMENEZ CABRAS y VÁZQUEZ I. (1993) "Calidad seminal en dosis descongeladas de toro". 5º Simposium Internacional de Reproducción Animal, Luso (Portugal), Vol. II: 201-206.

- JINO B., BURKMAN L.J. & CODDINGTON CC. (1987) "Human sperm hyperactivated motility (HA) and egg penetration". Biol. Reprod., 36: 53.
- KAN F.W.K. & LIN Y. (1996) "Topographical distribution of phospholipids in boar sperm plasma and intracellular membranes as revealed by freeze-fracture cytochemistry". J. Histochem. Cytochem., 44 (7): 687-701.
- KATO S., KUSUNOKI H., MIYAKE N., YASUI T. & KANDA S. (1985) "Penetration in vitro of zona-free hamster eggs by ejaculated goat spermatozoa preincubated in the uterus isolated from superovulated hamsters". Jpn J. Zootech. Sci., 56 (1): 62-66.
- KATZ D.F., DROBNIS E.Z. & OVERSTREET J.W. (1989) "Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments". Gamete Research, 22: 443-469.
- KOSOWER, N.S., KATAYOSE, H. & YANAGIMACHI, R. (1992) "Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei". J. Androl., 13: 342-348.
- KREYSING U., NAGAI T. & NIEMANN H. (1995) "Casein phosphopeptides enhance in vitro fertilization with semen of low penetrability". Theriogenology, 43 (1): 234.
- KRUGER T.F., ACOSTA A., SIMMONS K.F., SWANSON R.J., MATTA J.F. & OEHNINGER S. (1988) "Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization". Fertil. Steril., 49: 112-117.
- KRZYWINSKI A. & JACZEWSKI Z. (1978) "Observations on the artificial breeding of Red Deer". Symp. Zool. Soc. Lond., 43: 271-287.
- KUSUNOKI H.T. (1984) "Identificación de acrosome-reacted goat spermatozoa by a simplified triple-stain technique". Jpn. J. Zootech. Sci., 55: 832-837.
- KUSUNOKI H.T., SAKAVE M., KATO S. & KANDA S. (1989) "Induction of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa by preincubation in chemically defined medium". J. Exp. Zoology, 249: 322-328.
- LANGLAIS, J., KAN, F.W.K., GARGER, L., RAYMOND, L., BLEAU, G. & ROBERTS, K.D. (1988) "Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux human spermatozoa during in vitro capacitation". Gamete Res., 20: 185-201.
- LIN Y. & KAN F.W.K. (1996) "Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation". Biol. Reprod., 55: 1133-1146.
- LIU D.Y. & GORDON BAKER H.W. (1994) "Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro". Human Reprod., 9 (9): 1694-1700.
- LIU D.Y. & GORDON BAKER H.W. (1996) "A simple method for assessment of the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction". Human Reprod., 11 (3): 551-557.
- LORENZO P. (1994) "Fecundación y desarrollo embrionario temprano". En: Reproducción de los animales domésticos. Ed. Aedos. Cap. 6: 161-204.

- LLANOS M.N., LUI C.W. & MEIZEL S. (1982) "Studies of phospholipase A2 related to hamster sperm acrosome reaction". J. Exp. Zool., 221: 107-117.
- LLANOS M.N. & ANABALÓN M.C. (1996) "Studies related to progesterone-induced hamster sperm acrosome reaction". Molecular Reprod. Dev., 45: 313-319.
- MANN J. (1975) "Biochemistry of semen". In: Handbook of physiology, Section 7, Vol V. De. D.W. Hamilton and R.O. Greep, Washington D.C., American Physiological Society: 461-471.
- MANN J. (1981) "Spermatological investigations in African Dwarf goats (*Capra hircus*) kept in germany". Anim. Res. Develop., 14: 86-100.
- MARTIN R.H. & TAYLOR P.V. (1983) "Effect of sperm concentration in the zona-free hamster ova penetration assay". Fertil. steril., 39: 379-381.
- MARTÍN-LUNAS E., MARTINO A., PARAMIO M.T., PALOMO M.J., MOGAS M.T., BIESLA M.A., ANDOLZ P. & MARTINEZ P. (1996) "Effect of oocyte-sperm co-incubation on acrosome reaction in the goat". Theriogenology, 46: 321-330.
- MARTINO A., MOGAS T., PALOMO M.J. & PARAMIO M.T. (1995) "In vitro maturation and fertilization of prepuberal goat oocytes". Theriogenology, 43 (2): 473-485.
- MAXWELL W.M.C., CURNOCK R.H., LOGUE D.N. & REED H.C.B. (1980) "Fertility of ewes following artificial insemination with frozen in pellets or straws, a preliminary report". Theriogenology 14 (2): 83-89.
- MAXWELL W.M.C. y EVANS G. (1990) "Inseminación Artificial de ovejas y cabras". Ed. Acribia, S.A. (Madrid), Cap. 3-4: 19-32.
- MAZUR P. (1980) "Aspectos fundamentales de la congelación de células especialmente óvulos y embriones de mamíferos". 9th Intern. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem., Madrid 2: 99-114.
- MEIZEL S. & LUI C.W. (1976) "Evidence for the role of trypsin-like enzyme in the hamster sperm acrosomal reaction". J. Exp. Zool., 195: 137-144.
- MEMON M.A. & OTT R.S. (1981) "Methods of semen preservation an Artificial Insemination in sheep and goats. Anim. Prod., 17(1): 19-25.
- MEMON M.A.; BRETZLAFF K.N. & OTT R.S. (1986) "Comparison of semen collection techniques in goats". Theriogenology, 26 (6): 823-827.
- MENDOZA G., WHITE I.G. & CHOW P. (1989) "Studies on chemical components of Angora goat seminal plasma". Theriogenology, 32 (3): 455-466.
- MENDOZA C. (1996) "La reacción acrosómica en el espermatozoide humano". En: Reproducción humana. Ed. McGraw-Hill: Interamericana. Cap.12: 120-127.
- MOLINA F.C., EVANS G., QUINTANA P. & MAXWELL W.M.C. (1990) "Effect of mono- and disaccharides in tris-based diluents on motility of pellet-frozen ram spermatozoa". Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. 22: 66.
- MOLINA F.C., EVANS G. & MAXWELL W.M.C. (1996) "Fertility of ram spermatozoa pellet-frozen in zwitterion-buffered diluents". Reprod. Nutr. Dev., 36: 21-29.

- MONTERO N., CORTÉS S., TOMÉ A. y VÁZQUEZ I. (1995) "Yema de huevo desecada como crioprotector alternativo del semen ovino". VI Jornadas sobre Producción Animal. Vol. Extra. 16-Tomo I, ITEA: 419-421.
- MOORE R.W., DOW B.W. & STAPLES L.D. (1989) "Artificial insemination of farmed feral goats with frozen-thawed semen". Proceeding of New Zealand Society of Animal Production, 49: 171-173.
- MORALES P., VANTMAN D., BARROS C. & VIGIL P. (1991) "Human spermatozoa selected by percoll gradient or swim-up equally capable of binding to the human zona pellucida and undergoing the acrosome reaction". Human Reprod., 6 (3): 401-404.
- MORTIMER D., COURTOT A.M., GIOVANGRANDI Y., JEULIN C. & DAVID G. (1984) "Human sperm motility after migration into, and incubation in, synthetic media". Gamete Research, 9: 131-144.
- MORTIMER, D. (1995) "Sperm transport in the female genital tract". In: The spermatozoon. Ed. Cambridge University Press, Cap. 8: 157-174.
- MOUTAFFIAN H. & PARINAUD J. (1995) "Selection and characterization of human acrosome reacted spermatozoa". Human Reprod., 10(11): 2948-2951.
- MYLES D.G., HYATT H. & PRIMAKOO P. (1987) "Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertilization". Development Biol. 121:559-567.
- NAGAI T., NIWA K. & IRITANI A. (1984) "Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes". J. Reprod. Fert., 79: 271-275.
- NOLAN J.P. & HAMMERSTEDT R.H. (1997) "Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm". The FASEB Journal, 11: 670-682.
- NUNES J.F., CORTEEL J.M., COMBARNOUS Y., BARIL G. & LEBOEUF B. (1982) "Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc". Reprod. Nutr. Dévelop., 22 (4): 611-620.
- NUNES J.F. (1993 a) "El agua de coco como dilutor del semen caprino". Revista Científica. FCV-LUZ, III (3) :269-272.
- NUNES J.F. y FLORES SALLES M.G. (1993 b) "El agua de coco (*Cocos nucifera* L) "in natura" integral y adicionada con citoquinas, como dilutor de semen caprino". Revista Científica. FCV-LUZ, III (3) :273-281.
- NUÑEZ R., CABALLERO P., MESEGUER M^a, VÁZQUEZ I. y GALVEZ M. (1992 a) "Efectividad del "swimup" como metodo de eliminación bacteriana". Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana, IX (3): 141-145.
- NUÑEZ R., GARDE J., GUTIÉRREZ A., VÁZQUEZ I. y CABALLERO P. (1992 b) "Co-cultivo de espermatozoides y células epiteliales de oviducto: posible modelo para el estudio in vitro de la capacitación". Workshop on basic and clinical aspects of ovarian stimulation, fertilization and implantation in humans, Valencia (España)
- NUÑEZ R., CABALLERO P., LUENGOS A., ALSINA J. y VÁZQUEZ I. (1993) "Comportamiento cinético espermático pre y post condiciones de capacitación". VI Congreso Nacional de Andrología, Vigo (España): 239.

- NUÑEZ R., GONZALEZ P., VICENTE P., PUEYO E. Y CABALLERO P. (1994 a) "Efecto de la pentoxifilina en la reacción acrosómica espontánea". XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, Valencia (España).
- NUÑEZ R., VÁZQUEZ I., LUENGOS A., ALSINA J. y CABALLERO P. (1994 b) "Estudio comparativo de la reacción acrosómica en muestras procesadas por percoll y swim-up". XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, Valencia (España).
- NUÑEZ R., VÁZQUEZ I., ALSINA J., LUENGOS A y CABALLERO P. (1995) "Estudio de la movilidad y capacidad fecundante del espermatozoide en distintos hábitats". Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana, XII (1): 5-13.
- NUÑEZ R., CABALLERO P., CORTÉS S., ALSINA J. & VÁZQUEZ I. (1996) "The influence of sperm processing techniques in spontaneous acrosome reaction". 1st International meeting of biology and pathology on male reproduction, Madrid (España).
- O'CONNOR M.T., AMANN R.P. & SAACKE R.G. (1981) "Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standar laboratory test and their use for prediciting fertility". J. Anim. Sci., 53 (5): 1368-1376.
- OHYASHIKI T., OHTSUKA T. & MOHRI T. (1988) "Increase of the molecular rigidity of the protein conformation in the intestinal brush-border membranes by lipid peroxidation". Biochim. Biophys. Acta: 939: 383.
- OKERE C, CHIBOKA O. & MONTSMA G. (1986) "Effect of frequent ejaculation of west african Dwarf goat on semen characteristic". Animal Reprod. Sci., 11: 249-258.
- OLSON G.E. & WINFREY V. (1991) "Structure-function relationships in the sperm acrosome". Annals of the New York Academy of Sciences, 637: 240-257.
- O'RAND, M.G. (1977) "Restriction of a sperm surface antigen's mobility during capacitation". Devel. Biol., 55: 260-270.
- O'RAND, M.G. (1982) "Modification of the sperm membrane during capacitation". In "The cell biology of the testis". Ann. N.Y. Academy of Sciences, 383: 392-402.
- O'RAND M.G. (1987) "Localization of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zonae". Development Biol., 119: 551-559.
- O'TOOLE C.M.B., ROLDAN E.R.S., HAMPTON P. & FRASER L.R. (1996 a) "A role for diacylglycerol in human sperm acrosomal exocytosis". Mol. Human Reprod., 2 (5): 317-326.
- O'TOOLE C.M.B., ROLDAN E.R.S. & FRASER L.R. (1996 b) "Role for Ca²⁺ channels in the signal transduction pathway leading to acrosomal exocytosis in human spermatozoa". Mol. Reprod. Dev., 45: 204-211.
- PALOMO M.J., MOGAS T., IZQUIERDO M.D. & PARAMIO M.T. (1995) "Effect of heparin and sperm concentration on ivf of prepuberal goat oocytes". Theriogenology, 43 (1): 292.
- PARK C.S., YANG M.H., HWANG D.S., LEE K.S. & SEO K.W. (1989) "Study on fresh and deep-frozen storage of korean native goat spermatozoa". Korean J. Anim. Sci., 7: 412-419.

- PARK C.K. & SIRARD M.A. (1996) "The effect of preincubation of frozen-thawed spermatozoa with oviductal cells on the in vitro penetration of porcine oocytes". Theriogenology, 46: 1181-1189.
- PARRISH J.J., KROGENAES A. & SUSKO-PARRISH J.L. (1995) "Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development". Theriogenology, 44: 859-869.
- PELLICER M^a T. (1996) "Conservación del semen caprino. Interacción entre la secreción bulbouretral y el diluyente leche: Identificación y mecanismo de acción de los componentes en el deterioro espermático". Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. 200.
- PÉREZ B. (1992) "Estudios de los parámetros de valoración del rendimiento reproductivo en el macho cabrío de las razas Verata y Malagueña". Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. 196p.
- PÉREZ B. y MATEOS E. (1994) "Influencia del tiempo de "equilibración" en la calidad del semen caprino congelado". 7^a J. Int. Rep. An., Murcia (España).
- PÉREZ B. & MATEOS E. (1996) "Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds". Small Ruminant Research, 23: 23-28.
- PÉREZ F. (1996) "Estudio sobre la maduración espermática a lo largo del tracto reproductor masculino de conejo". Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Valencia. 175p.
- PÉREZ L.J., VALCÁRCEL A., DE LAS HERAS M.A., MOSES & BALDASSARRE H. (1997) "The storage of pure ram semen at room temperature result in capacitation of subpopulation of spermatozoa". Theriogenology, 47: 549-558.
- PÉREZ FUENTES J. y ALCAIDE M. (1993) "Vitalidad y congelación del espermatozo del morueco de raza Manchega. Efecto de la presión osmótica y de la concentración de glicerol en el diluyente". Mundo Ganadero, 10: 85-89.
- PÉREZ F., TABLADO L., DE MONSERRAT J.J. y SOLER C. (1994) "Análisis computerizado, mediante el sperm-class analyzer, de la motilidad espermática epididimaria en conejo". 7^a Jornadas Int. Reprod. Anim., Murcia (España).
- PÉREZ L.J., VALCÁRCEL A., DE LAS HERAS M.A., MOSES D. & BALDASSARRE H. (1996) "Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay". Theriogenology, 46: 131-140.
- PARINAUD J., VIEITEZ G., MOUTAFFIAN H., RICHOLLEY G & LABAL B. (1995) "Variations in spontaneous and induced acrosome reaction: correlations with semen parameters and in-vitro fertilization results". Human Reprod. 10 (8): 2085-2089.
- POMEROL J.M. y ARRONDO J.L. (1994) "Practica andrológica". Ed. Científicas y Técnicas, S.A.:20-198.
- PONTBRIAND D., HOWARD J.G., SCRIEWE M.C., STUART L.D. & WILDT D.E. (1989) "Effect for cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa". Cryobiology, 26: 341-354.
- QITTET E. (1986) "La reproducción" En: La cabra. Guia práctica para el ganadero. Ed. Mundi-prensa:171-184.

- QUINN, P.J. & WHITE, I. G., (1968) "Distribution of adenosinetriphosphate activity in ram and bull spermatozoa". J. Reprod. Fertil., 15: 449-452.
- RAO Y. (1957) "Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat". Nature, 179: 318-319.
- RENARD P., GRIZARD G., GRIVEAU J.F., SION B., BOUCHER D. & LANNOU D. (1996) "Improvement of motility and fertilization potential of postthaw human sperm using glutamine". Criobiology, 33: 311-319.
- RITAR A.J. & SALAMON S. (1982) "Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the angora goat". Aust. J. Biol. Sci., 35: 305-312.
- RITAR A.J., BALL P.D. & O'MAY P.J. (1990) "Examination of methods for the deep freezing of goat semen". Reprod. Fertil. Dev., 2: 27-34.
- RITAR A.J. & SALAMON S. (1991) "Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa". Small Ruminant Research, 4: 29-37.
- RITAR A.J. & BALL P.D. (1993) "The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination". Anim. Reprod. Sci., 31: 249-262.
- ROBERTSON L. & MORTIMER, D., (1988) "The effect of extracellular free Ca^{2+} on the development of hyperactivated motility in capacitating human spermatozoa". J. Reprod. Fertil. Abstr. Ser., 1:65.
- ROBERTSON L., BAIEY J.L. & BUHR M.M. (1990) "Effects of cold shock and phospholipase A_2 on intact spermatozoa and sperm head plasma membranes". Mol. Reprod. Dev., 26: 143-149.
- ROBERTSON L. & WATSON P.F. (1986) "Calcium transport in diluted or cooled ram semen". J. Reprod. Fert., 77: 177-185.
- ROCA J. (1989) "Parámetros reproductivos del macho cabrío de raza Murcian-Granadina. Estudio experimental". Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia: 191p.
- ROCA J., MARTINEZ E., VÁZQUEZ J.M. & COY P. (1992) "Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area". Anim. Rep. Sci., 29: 255-262.
- ROCA J., MARTINEZ E. & VÁZQUEZ J.M. (1993) "Seasonal variation in fructose and citric acid in seminal plasma of Murciano-Granadina goats". Small Ruminant Research, 10: 219-226.
- ROCA J., CARRIZOSA J.A., CAMPOS I., LAFUENTE A., VÁZQUEZ J.M. y MARTINEZ E. (1994) "Inseminación artificial con semen refrigerado en la raza caprina Murciana-Granadina: adecuación del diluyente". 7ª J.Int. Repro. Anim., Murcia (España): 329.
- ROGERS B.J. & YANAGIMACHI R. (1975) "Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction". Biol. Reprod., 13: 568-575.
- ROGERS B.J. (1985) "The sperm penetration assay: its usefulness reevaluated". Fertil. Steril., 43: 821-840.

- ROGERS B.J. & YANAGIMACHI R. (1975) "Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction". Biol. Reprod., 13: 568-575.
- ROLDAN E.R.S. & HARRISON A.P. (1989) "Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca^{2+} / ionophore-induced acrosome reaction of mammalian spermatozoa". Biochem. J., 259: 397-406.
- ROLDAN, E.R.S. (1994) "Biology of sperm membranes: Implications for capacitation and the acrosome reaction". 7ª J. Int. Reprod. Anim., Murcia (España): 53-59.
- ROY A. (1957) "Egg-yolk coagulating enzyme in semen and Cowper's gland of the goat". Nature (London), 179: 318-319.
- RYUL D., EUN J., SOO H. & IL ROH S. (1997) "Induction of acrosome reaction in human spermatozoa accelerates the time of pronucleus formation of hamster oocytes after intracytoplasmic sperm injection". Fertil. Steril., 67 (2): 315-320.
- SAACKE R.G. (1983) "Semen quality in relation to semen preservation". J. Dairy Sci., 66: 2635-2644.
- SAHNI K.L. & TIWARI S.B. (1992) "Caprine semen evaluation, processing and artificial insemination in India". V Int. Conference on Goats, New Delhi (India): 94-104.
- SALAMON S. & RITAR A.J. (1982) "Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and rate of dilution on survival of spermatozoa". Aust. J. Biol. Sci., 35: 295-303.
- SALAMON S. & MAXWELL W.M.C. (1995) "Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination". Anim. Reprod. Sci., 37: 185-249.
- SANCHEZ R & SCHILL W.B. (1991 a) "Induction of the acrosome reaction in sperm by exposure to low temperature increases their rate of fusion with zona-free hamster oocytes". Int. J. Androl., 14: 423-431.
- SANCHEZ R., TOEPFER-PETERSEN E., AITKEN R.J. & SCHILL W.B. (1991 b) "A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa". Andrologia, 23: 197-203.
- SANCHEZ R., RISOPATRÓN J., SEPÚLVEDA G., PEÑA P. & MISKA W. (1995) "Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa: effects of proteinase inhibitors". Theriogenology 43: 761-768.
- SANCHO M., PÉREZ F., TABLADO L y SOLER C. (1994) "Valoración morfológica y morfométrica, mediante el sperm-class analyzer, del semen eyaculado de morueco". 7ª J. Int. Reprod. Anim., Murcia (España): 131.
- SANTIAGO J., CORTÉS S., GONZALEZ DE BULNES A. y VINADER M.L. (1996) "Evaluación ecográfica de un prodeso de orquitis y vesiculitis seminal en un macho cabrío". Med. Vet., 13 (1): 49-54.
- SEIDEL G.E., LEIPOLD S.D. & SHAWKI H. (1995) "Preparation of bovine sperm for in vitro fertilization by swim-up or centrifugation through percoll or BSA". Theriogenology, 43(1): 319.

- SHI, Q.X. & ROLDAN, E.R.S. (1995) "Bicarbonate /CO₂ is not required for zona-pekucida or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa, but is essential for capacitation". Biol. Reprod., 52:540-546.
- SILBER S.J. (1995) "Epididymal and testicular spermatozoa and intracitoplasmic sperm injection". Ass. Reprod. Rev., 6 (1): 45-53.
- SINGH M.P., SINHA A.K. & SINGH B.K. (1995) "Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa". Theriogenology, 43: 1047-1053.
- SINGH M.P., SINHA A.K., SINGH B.K. & PRASAD R.L. (1996) "Effect of cryoprotectans on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing". Theriogenology, 45: 405-416.
- SINHA S., DEKA B.C., BORGOHAIN B.N. & TAMULI M.K. (1992) "Study on freezing of goat semen in skim milk extender with different glycerol levels and equilibration periods". Ind. J. Anim. Reprod., 13 (1): 38-41.
- SLAVIK T. (1987) "Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs". J. Anim. Reprod., 79: 99-103.
- SMITH M.C. & SHERMAN D.M. (1994) "Goat Medicine". Ed. Williams & Wilkins.
- SONG H.B. & IRITANI A. (1988) "In vitro fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa". Korean J. Animal. Sci., 30 (11): 636-642.
- SORIA V. (1995) "Crioprotectores alternativos para la criopreservación del semen de macho cabrío. Protocolo técnico". Tesina. Facultad de Veterinaria, UCM (España).
- SORENSEN A.M. Jr. (1982) "Reproducción animal. Principios y prácticas". Ed. McGraw-Hill. México: 539.
- STOCKERT J.C., BARRERA C. y MAZZOLLI A.B. (1991) "Metacromasia nuclear de espermatozoides humanos inducida por reducción de puentes disulfuro". IV Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular: 64.
- STOJANOV T., POMARES C.C., MAXWELL W.M.C. & EPPLESTON J. (1994) "Effect of cytochrome C on the survival of ram and goat spermatozoa during liquid storage". 7^a J. Int. Reprod. An., Murcia (España): 333.
- STOJANOFF, A., BOURNE, H., ANDREWS, A.G. & HYNE, R.V. (1988) "Phospholipids composition of isolated guinea pig sperm outer acrosomal membrane and plasma membrane during capacitation in vitro". Gamete Res., 21: 297-311.
- SUTTIYOTIN D. & THWAITER C.J. (1991) "The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa". Anim. Reprod. Sci., 25: 209-224.
- SUAREZ S. & OSMAN R. (1989) "Iniciation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract". Biol. Reprod., 44: 375-381.

- SUNDHEY, R., AHUJA, S.P. & SINGH, B. (1992) "Changes in the composition of membranes of buck (*Capra Hircus*) spermatozoa during epididymal maturation". Small Ruminant Research, 7: 135-149.
- TALBOT P. & CHACON R.S. (1981) "A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm". J. Exp. Zool., 215: 201-208.
- TAKAHASHI K., WETZELS A.M.M., GOVERDE H.J.M., BASTIAANS B.A., JANSSEN H.J.G. & ROLLAND R. (1992) "The kinetics of acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation in vitro fertilization". Fertil. Steril., 57 (4): 889-894
- TASSERON F., AMIR D. & SCHINDLER H. (1977) "Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution cooling and freezing". J. Reprod. Fertil., 55: 461-462.
- TATENO H. & KAMIGUCHI Y. (1996) "In vitro fertilization of Chinese hamster oocytes by spermatozoa that have undergone ionophore A23187-induced acrosome reaction, and their subsequent development blastocysts". Zygote, 4: 93-99.
- TEJADA R.I. MICHELL J.C. NORMAN A. MARIK J.J. & FRIEDMAN S. (1984) "A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence". Fertil. Steril. 42:87-91.
- TESARIK J. (1989) "Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon". Human. Reprod., 4: 957-961.
- TESARIK J., MENDOZA C. & CARRERAS A (1993) "Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction". Fertil. Steril., 59 (2): 424-430.
- TESARIK J. & MENDOZA C. (1995) "Alleviation of acrosome reaction prematurity by sperm treatment with egg yolk". Fertil. Steril., 63(1): 153-157.
- THEAU-CLEMENT M., LATTAIOLI P., ROUSTAN A. & CASTELLINI C. (1996) "Reliability and accuracy of a computerised semen image analyses to evaluate various biological parameters in rabbit semen". World Rabbit Congress, Toulouse, 2: 133.
- THWAITES C.J. (1995) "The comparative effects of undernutrition, exercise and frequency of ejaculation on the size and tone of the testes and on semen quality in the ram". Anim. Reprod. Sci., 37: 299-309.
- TOBBACK C., HOUGH S. & FOOTE R.H. (1991) "A procedure for cryopreservation of hamster oocytes yielding highly conserved oocytes suitable for sperm penetration". Fertil. Steril., 55 (1): 184-188.
- TOURNAYE H., WIENE P., JANSSENS R., VERHEYEN G., DEVROEY P & VAN STEIRTEGHEM A. (1994) "Incubation of spermatozoa from asthenozoospermic semen samples with pentoxifylline and 2-deoxyadenosine: variability in hyperactivation and acrosome reaction rates". Human Reprod., 9 (11): 2038-2043.
- TRESGUERRES J.A.F. (1989) "Fisiología endocrina". Ed. Eudema S.A.: 259-355.
- TROUP S.A., LIEBERMAN B.A. & MATSON P.L. (1994) "The acrosome reaction to ionophore challenge test: assay reproducibility, effect of sexual abstinence and results for fertile men". Human Reprod., 9 (11): 2079-2083.

- TULI R.K., SCHMIDT-BAULAIN R & HOLTZ W. (1991) "Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats". Anim. Reprod. Sci., 25: 125-131.
- TULI R.K., SCHMIDT-BAULAIN R & HOLTZ W. (1992) "Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of bull, boar and goat". Theriogenology 38: 487-490.
- TULI R.K. & HOLTZ W. (1994) "Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from boer goat spermatozoa". Theriogenology, 42: 547-555.
- VALCÁRCEL A., DE LAS HERAS M.A., PÉREZ L., MOSES D.F. & BALDASSARRE H. (1996) "Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining". Anim. Reprod. Sci., 45: 299-309.
- VARNER D., WARD C. STOREY B. & KENNEY R (1987) "Induction and charecrization of acrosome reaction in equine sperm". Am. J. Vet. Res., 48: 1383-1389.
- VÁZQUEZ I. (1980 a) "Nuevos métodos de valoración del semen en reproductores ovinos y porcinos". Tesis Doctoral. facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de León. España.
- VÁZQUEZ I. (1980 b) "Valoración de acrosomas normales en células espermáticas de verraco". Zootecnia 29: 507-512.
- VÁZQUEZ I., MARTÍNEZ F., CABALLERO P., PIEDRABUENA E. y DIAZ YUBERO C. (1984 a) "Endósmosis celular en espermatozoides". Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad. Santiago de Compostela (España): 123.
- VÁZQUEZ I., CABALLERO P. y PIEDRABUENA E. (1984 b) "Valoración electrónica del contenido celular del eyaculado". XVII Congreso de la Sociedad Española de feertilidad, Santiago de Compostela (España): 124.
- VÁZQUEZ I., MARTINEZ F., ALCAIDE M. y DIAZ YUBERO C. (1986) "Congelación del semen de morueco". XI J. Científicas de la S.E.O.C.: 169-176.
- VÁZQUEZ I., MARTINEZ F., PINTADO B., ALCALDE M. y DÍAZ YUBERO C. (1987) "Obtención del semen de morueco". España Agrícola Ganadera, II Etapa, 160: 59-60.
- VÁZQUEZ I., CABALLERO P. y NUÑEZ R. (1989) "Variaciones de la permeabilidad de membrana por efecto de la congelación del semen". Endocrinología, 36 (4) :159.
- VÁZQUEZ I., GRAHAM E.F., GARDE J., ARTIGA C.G. y GUTIERREZ A. (1991) "Influencia de la geometría de congelación sobre la fertilidad en inseminación artificial ovina con semen congelado". XVI Actas de las Jornadas Científicas de la S.E.O.C.: 121-123.
- VÁZQUEZ J.M. (1991) "Fecundación in vitro en la especie porcina: Análisis de la capacitación y reacción acrosómica". Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- VÁZQUEZ J.M., MARTINEZ E., ROCA J., COY P & PASTOR L.M. (1993) "Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization". Molecular Reprod. Dev., 36: 84-88.
- VIGIL P. y LEONTIC E. (1986) "El test de hamster. Test de fusión gamética heteróloga". Revista latinoamericana de Esterilidad y Fertilidad, I(1): 10-17.

- VINADER M.L., CORTÉS S. y VÁZQUEZ I. (1996 a) "Parámetros cinéticos para semen caprino en sistemas de análisis de imagen asistida por ordenador". IV Congreso Fe.Me.S.P.Rum, Murcia (España).
- VINADER M.L.; CORTÉS S.; VÁZQUEZ I. & NUÑEZ, R. (1996 b) "Cryopreservation of epididymal spermatozoa from nondomestic ruminants". 1st Int. Meeting of Biology and Pathology on Male Reprod., Madrid (España).
- VOLGLMAYR J., CHARTIER D. & SAWYER R. (1983) "Viability of ram testicular spermatozoa following criopreservation in rete testis fluid. Criobiology, 20: 421-431.
- WANG F.N., LEE S.N., TRENG C.Y. & LIN C.H. (1990) "Isolation and purification of bull semen by using Wang's tube". J. Chin. Soc. Anim. Sci., 19: 37-47.
- WASSARMAN P.M. (1990) "Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins". J. Reprod. Fert. Supl., 42: 79-87.
- WATANABE S. & MASUDA H. (1989) "Stimulating effect of exogenous phospholipase A2 on the acrosome reaction in hamster spermatozoa". Jpn. J. Zootech. Sci., 60 (6): 578-582.
- WATSON P.F. (1975) "Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa". Vet. Rec., 97: 12-15.
- WATSON P.F. & DUNCAN A.E. (1988) "Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa". Criobiology, 28: 131-142.
- WATSON P.F. (1990) "Artificial insemination and the preservation of semen" En: Lamming, G.E. (Ed.). Marshall's Physiology of Reproduction, 2: Reproduction in the male. Churchill Livingstone, Edimburgo: 747-869.
- WAY A.L.; HENAULT M.A. & KILLIAN G.J. (1995) "Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa". Theriogenology, 42: 1301-1316.
- WHITFIELD C.H. & PARKINSON T.J. (1995) "Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reaction with calcium ionophore (A23187)". Theriogenology 44: 413-422.
- WOLF D.P., SOKOLOSKI J.E. & QUIGLEY M.M. (1983) "Correlation of human in vitro fertilization with the hamster egg bioassay". Fertil. Steril., 40 (1): 53-59.
- YANAGIMACHI, R. (1970) "The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation". J. Reprod. Fertil., 23: 193-196.
- YANAGIMACHI R. (1984) "Zona -free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa". Gamete Research, 10: 187-195.
- YOVICH J.L. (1995) "Sperm preparation for assisted conception". In: "The Gametes: The spermatozoon", Ed.: Cambridge University Press.: 268-281.
- ZAVOS P.M., CORREA J.R., SOFIKITIS N., KOFINAS G.D. & ZARMAKOUPIIS P.N. (1995) "A method of short-term cryostorage and selection of viable sperm for use in the various assisted reproductive techniques". Tohoku. J. Exp. Med., 176 (2): 75-81.

ZHU J.J., BARRATT C.L.R., LIPPES J., PACEY A.A., LENTON E.A. & COOKE I.D. (1994) "Human oviductal fluid prolong sperm survival" Fertil. Steril., 61: 360-366.